

UNIVERSITE DE PARIS XI
INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

et

UNIVERSITE MANAR II
FACULTÉ DES SCIENCES DE TUNIS
THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

Présentée pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR EN PHYSIQUE

Par

Adel Aschi

***Effets du chlorure de guanidinium
sur la structure et les propriétés
de la caséine- β en solution et à
l'interface avec l'air.***

soutenue le 08/10/2001 à la faculté des Sciences de Tunis devant la commission d'examen
composée de :

Daoud Mohamed	LLB CEA Saclay	Président
Auvray Loïc	LLB CEA Saclay	Rapporteur
Ben Ouada Hafedh	Faculté des Sciences de Monastir	Rapporteur
Belhadj Omrane	Faculté des Sciences de Tunis	
Calmettes Patrick	LLB CEA Saclay	
Douillard Roger	INRA Reims	
Gharbi Abdelhafidh	Faculté des Sciences de Tunis	
Meunier Jean-Claude	INA-Paris Grignon	

Cette thèse cotutelle a été réalisée au laboratoire Léon brillouin du centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, au laboratoire de Biochimie des Macromolécules Végétales, INRA de Reims, au laboratoire de Physique de la Matière Molle de Tunis au laboratoire de Biochimie et Biotechnologie de Tunis et au laboratoire de l'école Normale Supérieure de Paris.

Mes plus sincères remerciements à Abdelhafidh Gharbi, Jean Claude Meunier Mohamed Daoud, Patrick Calmettes et Roger Douillard qui ont dirigé cette thèse et qui m'ont supporté quotidiennement dans ses bureaux. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance, ainsi que mon amitié la plus sincère. Ils m'ont initié avec patience à la physique des polymères et ont su me faire partager ses enthousiasmes pour ce domaine. Ses gentillesse, reconnues par tous, ses bonnes humeurs perpétuelles et ses optimismes toujours présent m'ont accompagnés durant ce travail de cinq années. Ses aides et ses aptitudes à toujours orienter les recherches dans la bonne direction ont été fondamentales dans la réalisation de ce travail.

Je remercie particulièrement Hafedh Ben Ouada et Loïc Auvray d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci pour leurs corrections, et leurs remarques judicieuses qui ont permis de grandement améliorer ce manuscrit.

Je tiens à remercier très sincèrement Véronique Aguié Béghin, qui aura supervisé une grande partie de ce travail de thèse, notamment tout ce qui concerne la réflectivité des neutrons, la tensiométrie et la chromatographie. Je tiens à la remercier pour toutes les explications qu'elle a su m'apporter à toute heure du jour, pour son immense disponibilité, et ses encouragements permanents.

Je suis particulièrement reconnaissant à Lotfi Bitri, pour notre collaboration qui fut d'une grande importance. La réalisation de l'expérience de chromatographie qui fut très enrichissante, n'aurait pu être possible sans la participation active de Omrane Bel Hadj.

Nicolas Puff, Samuel Guillot et Didier Lairez ont permis des échanges fructueux. Qu'ils soient assurés de mes plus sincères remerciements. Ils ont su, d'autre part, animer

avec chaleur et beaucoup de gaieté le couloir. Ma reconnaissance va également à Mondher Jebari qui s'est intéressé à une partie de ce travail.

Je remercie également Chantal Marais, Christelle Abraham et Chantal ainsi que l'ensemble informatique du ''LLB '' pour leurs compétences et leurs grandes disponibilités.

J'adresse un grand remerciement encore à Leïla Bhira pour ces encouragements et ces patiences envers moi.

J'adresse un grand remerciement à Olfa Ayachi pour sa disponibilité et ses encouragements dans tous les moments difficiles de ma thèse.

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
<u>Chapitre I</u>	6
GENERALITES	6
1. LES PROTÉINES	6
1.1. structure native des protéines	6
1.2. Effets de la dénaturation par le chlorure de guanidinium	9
2. ADSORPTION DES PROTÉINES.	9
3. CASEINE β	11
3.1. Structure primaire	11
3.2. Propriétés physiques de la caséine β	14
3.2.1 Monomère	14
3.2.2 Micelles	16
3.2.3 Propriétés interfaciales	17
4. ADSORPTION DE COPOLYMERES MULTIBLOCS	18
4.1. Modèle de copolymère multibloc	18
4.1.1. Structure de la couche interfaciale dans différents régimes	19
4.1.1.1. Molécule isolée	19
4.1.1.2. Régime dilué	20
4.1.1.3. Premier régime semi-dilué	20
4.1.1.4. Régimes au de la concentration de recouvrement des blocs	21
4.1.1.4.1. Régimes du côté gaz de l'interface.	22
- Régime semi-dilué à deux dimensions	22
- Régime du quasi-fondu	22
- Quasi-brosses du quasi-fondu	23
4.1.1.4.2. Régimes du côté liquide de l'interface	23
- Régime semi-dilué	23
- Epaisseur de la couche du côté liquide de l'interface	24
4.2.2. Diagramme de phase	26

4.2.2.1.	Pression de surface dans les différents régimes	27
	- Régimes gazeux	27
	- Régimes semi-dilués	28
	- Régimes Quasi fondu	28
4.2.3.	Conformation des blocs isolés.	30
4.2.3.1.	Mesure des propriétés des couches d'adsorption	33
4.2.3.2.	Relations entre le module dilatationnel et la pression de surface	34
5.	OBJECTIFS DE LA THÈSE	34

<u>Chapitre II</u>	36
---------------------------	-----------

MATERIELS ET METHODES	36
------------------------------	-----------

1.	DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES	36
1.1.	Principe de la D.N.P.A	37
1.2.	Expression de l'intensité diffusée	38
1.2.1.	Cas général	38
1.2.2.	Solutions colloïdales idéales	39
1.2.3.	Interactions	40
1.3.	Rayon de giration	41
1.3.1.	Définition	41
1.3.2.	Approximation de Guinier	42
1.4.	Diffusion par des chaînes polymériques	43
1.4.1.	Chaînes flexibles	43
1.4.2.	Chaîne à longueur de persistance	44
1.4.2.1.	Chaîne vermiciforme idéale	45
1.4.2.2.	Chaîne vermiciforme avec volume exclu	47
1.4.2.3.	Chaîne réelle	48
1.4.2.4.	Effets concentration	49
1.5.	Diffusion par les micelles de caséine β	53
1.6.	Mesures de la diffusion des neutrons	55
1.6.1.	Appareillage	55
1.6.2.	Conditions expérimentales	56

1.6.3.	Traitement des spectres bruts	58
1.6.3.1.	Transmissions	58
1.6.3.2.	Intensité diffusée	58
1.6.3.3.	Traitement des spectres bruts	60
1.6.3.4.	Calibration absolue	60
1.6.3.5.	Bruit de fond incohérent.	61
2.	REFLECTIVITE DE NEUTRONS	63
2.1.	Principe de la réflectivité	63
2.1.1.	Interface parfaite : réflectivité de Fresnel	64
2.2.	Mesures de la Réflectivité de neutrons	65
2.2.1.	Réflectomètre	66
2.2.2.	Conditions expérimentales	67
2.2.3.	Détermination du profil de concentration à partir des courbes de réflectivité	67
	- Modèle à deux couches	68
	- Modèle à double exponentielle	69
	- Modèle en loi de puissance avec une queue exponentielle	69
2.2.4.	Calcul de la densité de longueur : du substrat	70
2.2.5.	Calcul de la densité de longueur de diffusion : de la caséine β	71
3.	TENSION DE SURFACE STATIQUE ET DYNAMIQUE	71
3.1.	Mesures de la tension de la surface	72
3.1.1.	Principe de l'appareil	72
3.1.2.	Principe du calcul de la tension de surface	73
4.	PREPARATION DES ECHANTILLONS	74
4.1.	Préparation de la caséine β	74
4.1.1.	Mesure de la concentration	76
4.1.2.	Préparation du chlorure de guanidinium	77
4.1.3.	Mesure de la concentration	78
4.1.4.	Préparation des échantillons pour les expériences	78
4.1.4.1.	Dans l'eau légère	78
4.1.4.2.	Dans l'eau lourde	78

Chapitre III	79
---------------------	-----------

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	79
--------------------------------	-----------

1. INTRODUCTION	79
2. PROPRIÉTÉS D'AGRÉGATION DE PROTÉINES EN MILIEU DÉNATURANT	80
2.1. Résultats DNPA	80
2.1.1. Effet du dénaturant sur la caséine β en solution	80
2.1.2. Interactions de volume exclu	88
2.1.3. Chaîne de Kratky et Prod	89
2.2. Etude des Micelles	93
2.2.1. Introduction	93
2.2.2. Résultats	93
2.2.3. Etude locale et globale des micelles de caséine β	95
3. STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS DES COUCHES D'ADSORPTION DE CASÉINE-β FORMÉES À L'INTERFACE AIR / LIQUIDE EN MILIEU DÉNATURANT	102
3.1. Structure des couches d'adsorption de caséine-β: Mesures de réflectivité	102
3.1.1. Effet de la concentration en GdmCl	102
3.1.2. Effet de la concentration en protéine	105
3.1.3. Effet de la température	107
3.2. Propriétés des couches d'adsorption de caséine-β	108
3.2.1. Propriétés dynamiques des couches d'adsorption	108
3.2.1.1. Effet de la température	110
3.2.1.2. Effet de la concentration en GdmCl	111
3.2.1.3. Propriétés d'équilibre	113
Conclusion	115
<hr/>	
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	118
Références	121

Introduction

Les protéines sont des agents tensioactifs naturellement présents dans les produits alimentaires. Elles sont impliquées dans la stabilité de la plupart des émulsions naturelles, telles que le lait. Elles stabilisent les émulsions et les mousses modèles de façon très efficace vis à vis du processus de coalescence. L'utilisation de protéines natives ou modifiées en tant qu'agents moussants ou émulsifiants dans les formulations alimentaires ou cosmétiques est donc potentiellement intéressante et retient l'attention des industriels.

L'adsorption des protéines aux interfaces gaz/liquide et liquide/liquide a acquis ces dernières années une certaine maturité. La compréhension de la plupart des systèmes étudiés et des sujets abordés est encore partielle, mais de plus en plus de résultats expérimentaux et de prévisions théoriques sont confrontés avec succès. L'interprétation des résultats de ces systèmes fait de plus en plus appel aux théories élaborées dans le cas des polymères organiques.

Pour décrire des structures aussi complexes que les solutions de protéines, il fallait disposer de modèles théoriques suffisamment puissants qui tiennent compte des interactions mises en jeu entre la protéine et le solvant d'une part et la protéine et l'interface d'autre part, suffisamment réalistes pour être applicables à de nombreux cas pratiques, suffisamment simples enfin pour pouvoir être compris et utilisés. En se basant sur l'importance des lois d'échelles dans la physique des polymères¹, P.G. de Gennes a ouvert la voie. Il a donné une nouvelle vision de la physique². Une physique où théoriciens et expérimentateurs parlent le même langage, une physique qui n'ignore plus les autres disciplines qu'elle soient scientifiques ou non. Très vite, les nouveaux concepts d'échelle ont été appliqués au cas spécifique des polymères aux interfaces. En 1977, S. Alexander traite le cas des couches de polymères greffés³. Lorsque des chaînes de polymères sont fixées par l'une de leurs extrémités sur une paroi immergée dans une solution de bon solvant et que leur densité par unité de surface est suffisamment importante, elles s'étirent mutuellement pour former une sorte de « brosse ». En 1981, P.G. de Gennes montre qu'une couche de chaînes de polymères adsorbées à l'interface d'une solution de bon solvant, a une remarquable structure auto-similaire⁴. Depuis, de nombreux physiciens se sont plus ou moins inspirés de ses travaux, pour décrire des systèmes de plus en plus complexes, telles que les protéines, en s'efforçant

d'être aussi réalistes et aussi simples que possible et en tenant compte pour chaque nouveau système déjà connu et qui en fait spécificité.

La vérification expérimentale de ces résultats théoriques n'a pas été immédiate. D'abord, parce que jusque dans le courant des années 1970, malgré les travaux de quelques pionniers comme A. Silberberg⁵, l'étude des polymères aux interfaces était perçue par les expérimentateurs comme un domaine difficile à intégrer dans un schéma général. Leurs recherches étaient surtout motivés par de vastes perspectives d'applications, allant de la stabilisation colloïdale à la purification des eaux usées⁶. Ensuite, parce qu'il n'est pas toujours facile de synthétiser des systèmes proches des modèles théoriques. Enfin, parce que les techniques spectroscopiques⁷⁻⁹, hydrodynamiques¹⁰, ellipsométriques¹¹ ou tensiométriques¹², principalement utilisées jusqu'en 1985 dans la physique des interfaces ne permettent pas de sonder la structure interne d'une couche à l'échelle moléculaire. Les progrès du génie chimique, le recours aux techniques de réflectivité^{13,14} et de diffusion centrale des neutrons^{15,16}, le développement de techniques entièrement nouvelles, telles que les mesures de fluorescence par ondes évanescentes de rayon X¹⁷ ou la machine à mesurer les forces entre surfaces¹⁸, ont progressivement permis aux études expérimentales de rejoindre les études théoriques. A partir de 1987, de très belles expériences sont réalisées par réflexion de neutrons pour étudier notamment l'interdiffusion de couches de polymères¹⁹, la transition ordre désordre à l'intérieur de films minces de copolymères²⁰, l'adsorption de surfactants²¹ ou de polymères²² à la surface d'une solution.

Notre intérêt est d'étudier le comportement d'adsorption, à l'interface air / liquide, d'une protéine modèle bien-connue, la caséine β . L'interface air / eau sert comme un excellent modèle de la surface hydrophobe pour étudier l'adsorption de protéine parce qu'elle est homogène et facilement reproduite. Les premières et initiales mesures des protéines aux interfaces sont liées aux isothermes d'adsorption. Graham et Phillips²³ ont constaté que la saturation de la mono-couche de la protéine, se produit à 2 ou 3 mg/m² et ceci coïncide avec la réduction maximale dans la surface et les tensions interfaciale.

Les mesures d'isotherme sur la caséine β faites par Hunter et al²⁴ en grande partie confirment et étendent les études de Graham et Phillips. Par des calculs de la moyenne d'une surface par molécule dans le plateau d'adsorption, Hunter et al²⁴ déduisent que peut-être, un tiers de la protéine est orienté en dehors de la surface de l'interface. Dans la littérature, une

structure à deux couches a été souvent suggérée pour la caséine β à l'interface. Dickinson et al.²⁵ ont employé la réflectivité de neutron pour étudier la caséine β adsorbés aux interfaces air / eau et huile / eau. Ils ont ajusté leurs résultats par le modèle à deux-couches, avec une fraction volumique de 0,94 dans la première couche, d'épaisseur 20 Å, et 0,14 à 0,21 dans la seconde couche, d'épaisseur 50 à 70 Å. À l'interface air / eau et pour une concentration en volume de 5×10^{-3} % en masse, la concentration de surface est estimée de 3,8 mg/m². Ils ont observé seulement de petites différences pour les deux types d'interfaces. Étudiant l'adsorption de la caséine β sur les mono-couches d'OTS, Fragneto et al.²⁶ ont étonnamment trouvé que la précédente concentration de surface est élevée, étant donné que leur surface devrait être beaucoup plus hydrophobe par rapport à l'interface air / eau. Cependant, leurs données, pour une concentration en volume de 5×10^{-3} % en masse, ont été bien adaptées par le modèle à deux-couches dans lequel la première couche a une épaisseur de 23 Å et une fraction de volume de 0,61. La deuxième couche a une épaisseur de 35 Å et une fraction de volume de 0,12. Dans une autre étude récente par réflectivité de neutron, Atkinson et al.²⁷ ont trouvés, pour une concentration en volume de 5×10^{-3} % en masse, une concentration de surface de 2,13 mg/m² et une couche globale d'épaisseur de 54 Å. Caldwell et al.²⁸ ont étudié l'adsorption de la caséine β sur une bille de latex de polystyrène et ils ont déduit par diffusion de la lumière dynamique une épaisseur de la couche de 150 Å. Des résultats semblables ont été obtenus par réflectivité des rayons X avec des concentrations de caséine β augmentant de 10 à 1000 mg/L. Harzallah et al.²⁹ ont donnés une interprétation qu'une partie des blocs hydrophobes de la protéine est éjectée dans la phase liquide pour former un quasi-fondu du côté air de l'interface.

Il est clair des résultats cités ci-dessus qu'une compréhension complète du processus d'adsorption de la caséine β n'a pas été encore réalisée. Il est cependant vraisemblable que le comportement des protéines s'écartent sensiblement de celui de molécules idéales car les interactions entre monomères (acides aminés) sont fortes et nombreuses, conduisant souvent, en solution à des structures compactes et, aux interfaces, à des propriétés rhéologiques (module de compressibilité) marquées. En présence d'agents dénaturants qui diminuent les interactions entre monomères, les propriétés des protéines en solution se rapprochent de celles de polymères en conditions de bon solvant³⁰⁻³². L'étude de leur comportement d'adsorption à l'interface eau/air, dans ces conditions, devrait aussi permettre de juger, par comparaison avec le cas où il n'y a pas de dénaturant, de l'importance des interactions entre les monomères dans

la structure et les propriétés des couches interfaciales. L'étude de la dissociation des micelles par diffusion de neutrons aux petits angles (LLB Saclay), précédant celle des couches d'adsorption, permettra de définir des milieux où la protéine est en bon ou assez bon solvant. Dans ces conditions de milieu, on déterminera la structure de la couche d'adsorption formée à l'interface avec l'air, en particulier l'épaisseur et la fraction volumique en protéine. La comparaison de ces paramètres des couches d'adsorption formées en présence et en absence de dénaturant devrait refléter la variation de qualité du solvant. On s'attend, en particulier, à une diminution de la fraction volumique en protéine. L'interprétation des résultats obtenus par réflectivité des neutrons (LLB Saclay) devra s'appuyer sur la connaissance de la structure de l'interface du milieu dénaturant dépourvu de protéine. Il ne semble pas possible de préparer des solutions où le contraste pour les neutrons entre l'eau et l'agent dénaturant soit suffisant. Cette partie de l'étude a été effectuée par réflectivité des rayons X à l'ENS. Le changement des qualités de solvant et de comportement d'agrégation, devrait aussi se manifester dans les propriétés thermodynamiques de la couche d'adsorption. Celles-ci ont été étudiées par tensiométrie à l'équilibre et en régime dynamique de façon complémentaire à l'INRA (Reims).

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous présentons un rappel détaillé des propriétés importantes des protéines, aussi bien en solution qu'au voisinage d'une interface. Nous présentons brièvement les caractéristiques structurales et physico-chimiques des protéines et les méthodes couramment employées pour leur purification et leur caractérisation. L'exposé sera limité aux protéines du lait de vache et en particulier à la caséine β dont l'étude des propriétés d'agrégation et d'adsorption est le principal objectif de cette thèse.

Dans le deuxième chapitre, seront présentées les méthodes, les expériences utilisées et quelques principes théoriques pour étudier les propriétés structurales des milieux colloïdaux. Nous présentons brièvement les techniques de diffusion des neutrons, de réflectivité de neutrons et du tensiomètre à bulle.

Lors du troisième chapitre, nous caractérisons dans une première partie la caséine β en solution par diffusion des neutrons aux petits angles et nous établissons des courbes de transition entre l'état micellaire et l'état de chaîne à volume exclu en fonction de la concentration en chlorure de guanidinium et de la température.

Dans une seconde partie, nous étudions la structure et les propriétés de surface de la protéine à l'interface air/liquide dans les mêmes conditions par de mesures de réflectivité des neutrons et de tensiométrie statique et dynamique. L'interprétation des résultats à l'aide du modèle thermodynamique développé à partir d'un modèle de polymère asymétrique, permet de juger l'importance des conditions de solvants et des interactions entre monomères sur la structure et les propriétés des couches d'adsorption de protéines à l'interface air/liquide.

Nous donnons une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre études et qui permet de monter les perspectives de développement de ce travail.

CHAPITRE I

GENERALITÉS

Les protéines du lait sont parmi les plus largement consommées. La longue histoire de leur inclusion dans le régime alimentaire des humains et la facilité relative avec laquelle les fractions principales des protéines du lait peuvent être préparées à partir du lait cru ont fait de ce fluide l'un des domaines d'intérêt des premiers biochimistes tels que Hammarsten et Linderström-Lang. En conséquence, les protéines du lait sont les mieux caractérisées de toutes les protéines nutritives. Par exemple, la structure primaire des principales protéines du lait est connue. Les plus communes de ces protéines sont les caséines. Leur conformation et leurs propriétés physiques ne sont ni celles des protéines globulaires ni celles des protéines fibreuses.

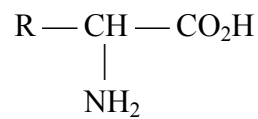
Ce premier chapitre concerne les caractéristiques structurales et physico-chimiques des protéines et les méthodes couramment employées pour leur purification et leur caractérisation. L'exposé sera limité aux protéines du lait de vache, et en particulier à la caséine β dont l'étude des propriétés d'agrégation et d'adsorption est le principal objectif de cette thèse.

1. LES PROTEINES

1.1. structure native des protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées d'une ou plusieurs chaînes formées d'une succession d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques. Il existe une vingtaine d'acides aminés dans les protéines naturelles. Chaque acide aminé possède un groupement

amine, NH_2 , et un groupement carboxylique, CO_2H , faiblement acide porté par le même atome de carbone asymétrique. La formule générale est :



où R représente la chaîne latérale, aussi appelée résidu.

La séquence des acides aminés le long de la chaîne détermine la structure primaire. La structure secondaire résulte du fait que des liaisons hydrogène s'établissent entre l'oxygène d'un carboxyle et l'hydrogène d'un résidu aminé des liaisons peptidiques, formant ainsi des structures en hélice α ou en feuillet β . La structure tertiaire résulte de l'organisation d'une chaîne peptidique en une configuration compacte mettant en contact des acides aminés éloignés dans la chaîne. Elle est maintenue par des forces de liaison non covalentes de faible énergie et parfois par des liaisons bisulfure entre résidus cystényls. Cette organisation dispose les radicaux actifs dans un ordre qui conditionne l'activité fonctionnelle de la protéine. La structure quaternaire correspond à l'assemblage de plusieurs unités de structure tertiaire pour former la protéine fonctionnelle. Cette association peut être covalente ou non. Elle est très souvent due à l'effet hydrophobe. C'est le cas des protéines fortement hydrophobes comme la lactoglobuline β qui s'associe en dimères ou en octamères selon la valeur du pH et les caséines qui forment des micelles. Le tableau.I-1 résume les caractéristiques des interactions impliquées dans la stabilisation des structures protéiques.

D'un point de vue structural il est possible de distinguer deux types majeurs de protéines : les protéines fibreuses des tissus de soutien, comme le collagène ou la kératine, et des protéines globulaires possédant souvent une activité biologique, comme les hormones ou les enzymes. Les caséines sont assez peu structurées et ne sont donc ni fibreuses ni globulaires. Elles forment naturellement des micelles qui servent à transporter le calcium.

Les techniques les plus employées pour analyser la structure secondaire des protéines sont le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge. La cristallographie par rayons X et la résonance magnétique permettent de déterminer complètement la structure tridimensionnelle des protéines à l'échelle atomique. C'est la cristallographie qui a fourni les

structures des protéines qui ont servi de références aux techniques spectroscopiques. Par contre, lorsqu'une protéine est très peu structurée les techniques précédentes deviennent peu utiles. Il faut alors recourir à la diffusion des neutrons ou des rayons X aux petits angles pour obtenir des informations sur sa configuration.

Types d'interaction	Energie de liaison (kJ.mol ⁻¹)	Distance d'interaction (nm)	Influence d'une élévation		
			de la température	du pH	de la force ionique
Covalente :					
Liaison bisulfure	320-380	0.1-0.2	aucune	oui	non
Non covalentes :					
Interactions électrostatiques	25-50	0.2-0.3	diminue	oui	oui
Liaison hydrogène	10-40	0.2-1.3	diminue	non	oui
Interactions hydrophobes	3-10	0.3-1	augmente	non	oui
Forces de Van der Waals	1-20	0.1-0.4	diminue	non	oui

Tableau. I-1. Caractéristiques des interactions impliquées dans la stabilisation des structures protéiques.^{.33}

L'état natif d'une protéine correspond à un état thermodynamique stable, c'est à dire à l'état d'énergie libre minimum. Pour le démontrer il est suffisant de démontrer que l'état natif est une fonction d'état qui ne dépend pas du processus de repliement, et donc qu'il constitue l'état d'énergie minimale accessible pendant le processus de repliement. Cette idée a été confirmée par la découverte de la réversibilité du processus de repliement. Les premières expériences sur la réversibilité furent celles de Anson^{.34} et Mirsky^{.34, 36} qui démontraient la réversibilité de repliement de l'hémoglobine en mettant en évidence la similarité des propriétés de l'état natif et de l'état "renaturé". Depuis il a été montré que la dénaturation de plusieurs protéines, qu'elles comprennent un ou plusieurs domaines est thermodynamiquement réversible. Cela signifie que la structure finale doit correspondre au minimum d'énergie, celui le plus bas de tous les autres états accessibles.

1.2. Effets de la dénaturation par le chlorure de guanidinium

Contrairement à la structure native des protéines, la structure des états dénaturés a longtemps suscité très peu d'intérêt. Ce n'est que récemment que les études sur ces états ont commencé à se multiplier, conduisant à des revues consacrées uniquement à ce sujet.^{.36-38} La raison de ce manque d'intérêt est double: d'une part, l'état dénaturé, dans lequel se trouve une protéine soumise à des conditions de dénaturation plus ou moins drastiques, a longtemps été considérée comme un état totalement déstructuré et possédant une conformation strictement aléatoire, ce que l'on appelle pelote statique, ou "random coil" en anglais; d'autre part, parce que justement il n'est pas aussi structuré que la protéine native, il est beaucoup plus difficile à étudier et à caractériser. Pourtant, les états dénaturés jouent un rôle crucial dans la stabilité des protéines, car celle-ci est définie par la différence d'énergie libre entre les deux états, l'état dénaturé et l'état natif d'une protéine.

Tanford^{39,40} a été l'un des premiers à se pencher sérieusement sur la structure des états dénaturés. Il a ainsi montré qu'en présence de 6 M de chlorure de guanidinium, le rayon hydrodynamique d'un grand nombre de petites protéines correspondait bien aux valeurs prédites pour un "random coil". Depuis, des études récentes ont attesté que des quantités significatives de structures résiduelles pouvaient encore être détectées même en présence de fortes concentrations de dénaturant, montrant que l'état dénaturé n'est pas toujours constitué d'une distribution de conformations strictement aléatoires. Ainsi, des mesures par diffusion de rayons X ont montré que le rayon de giration de la ribonucléase réduite, en présence de 6 M de chlorure de guanidinium, restait largement inférieur à la valeur prédite pour un "random coil" (24 Å au lieu de 43 Å)^{.41}.

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) est particulièrement intéressante pour détecter et caractériser une structure locale dans différentes conditions de dénaturation, et permet ainsi notamment de mettre en évidence l'existence de structures résiduelles dans des protéines dénaturées. Dans 7 M d'urée, un amas hydrophobe impliquant quatre chaînes latérales hydrophobes à l'intérieur d'un segment de six résidus a ainsi été détecté dans la structure de répresseur 434^{.42}. Dans le lysozyme de poule dénaturé par la chaleur, il existe de légères déviations de déplacement chimique que l'on attend pour ce protons dans un "random coil"^{.43}, l'addition d'agents dénaturants supplémentaires, ou la réduction des ponts disulfure, montre que ces déviations peuvent être éliminées, suggérant

que ces déviations du déplacement chimique ne proviennent pas d'un effet de séquence mais d'un effet de structure traduisant l'existence d'interactions résiduelles.

A la lumière de ces derniers résultats, il semblerait donc que l'état dénaturé serait plus correctement décrit par une distribution de conformations très faiblement structurées, et dans lesquelles la présence de structure résiduelles n'est pas rare, quels que soient la protéine et le type de dénaturation qu'elle subit. Alors que la plupart des recherches se sont longtemps concentrées sur les interactions qui stabilisent l'état natif, il est établi maintenant que les agents dénaturants, conduisant à une déstabilisation des protéines, contribuent en fait plus exactement à une stabilisation de l'état dénaturé.³⁸ Il est donc permis de penser que les interactions présentes dans l'état dénaturé puisqu'il peut y avoir des structures résiduelles peuvent jouer un rôle dans la stabilisation de la conformation native par un effet sur l'énergie libre de l'état dénaturé.

2. ADSORPTION DES PROTEINES.

Les molécules de protéine sont amphipatiques en nature en raison de la présence du mélange des groupes polaires et non polaires sur leur surface. Ceci rend les molécules de protéine tensioactive, de sorte qu'elles tendent à adsorber aux interfaces telles que gaz-liquide, liquide-liquide et solide-liquide.

La surface d'activité des protéines est importante dans de nombreux processus industriels et produits, y compris des stabilisateurs de nourriture et des émulsifiants dans les industries alimentaires^{44,45} et la séparation de protéine de nourriture biologique influée par le fractionnement de mousse.⁴⁶ Les protéines peuvent servir comme des stabilisateurs efficaces pour les émulsions, par eux-mêmes ou avec d'autres agents tensioactifs, en donnant la rigidité structurale à l'interface avec leurs couches adsorbées. En outre, leur surface d'activité peut être exploitée dans la reprise des solutions diluées des protéines par le fractionnement de mousse, qui est fortement efficace et peut-être économiquement viable comparé à des méthodes intensives telles que la chromatographie ou les séparations membranaire.

Les tentatives de décrire l'adsorption des protéines aux interfaces gaz-liquide ont supposé que l'adsorption de protéine soit assimilée à une diffusion contrôlée. Plusieurs résultats expérimentaux^{47,48} sur l'adsorption de protéine semblent supporter une telle

prétention aux concentrations très élevées de la protéine. Cependant, à basses concentrations de protéine, les déviations entre les rapports prévue par l'expérience et l'adsorption ont été prononcé par l'intermédiaire de la méthode de diffusion contrôlée.^{.23 47.49} Les anomalies ont été attribuées aux effets de la convection du liquide.^{.48} Un tel comportement a été attribué à la présence des barrières d'énergie dans l'adsorption de protéine.^{.50} Ces barrières d'énergie se sont avérées dues aux effets de pression de surface^{.51} aussi bien que de la double répulsion électrique de couche.^{.52} L'adsorption de protéine est sensée se produire en trois étapes distinctes. La première étape est la diffusion de molécules de protéine dans la sous-surface juste au-dessous de l'interface. Après ces molécules de protéine sont ensuite adsorbées avoir surmonter diverses barrières d'énergie. Finalement, elles se réarrangent à l'interface,^{.53.54} ayant pour résultat un partiel dépliement des segments adsorbés. Graham et Phillips dans une série de papiers^{.23.53} ont examiné l'adsorption des modèles de protéines telles que le sérum d'albumine (BSA), la caséine- β , et le lysozyme aux interfaces air-eau et huile-eau. Ils ont conclu que l'extension du dépliement des protéines globulaires dépend de la pression de surface et que l'échelle de temps du réarrangement de la surface est beaucoup plus longue que celle de l'adsorption.^{.54.55} La recherche sur l'adsorption de (BSA) avec différents degrés de dénaturation^{.49} a montré que la protéine dénaturée (qui est plus grande dans sa taille) s'adsorbe plus rapidement que la protéine native, indiquant de ce fait une connexion entre la structure de protéine et son comportement d'adsorption. Le taux d'adsorption a été directement lié à l'hydrophobicité de sa surface,^{.56} qui est une force d'entraînement principale pour l'adsorption de protéine à l'interface air-liquide.

3. CASEINE β

3.1. Structure primaire

La connaissance de la séquence des résidus dans la chaîne polypeptidique peut fournir des informations importantes sur les caractéristiques structurales d'une protéine. Pour une séquence donnée, la structure native est l'état thermodynamique correspondant à la valeur la plus basse de l'énergie libre. Elle dépend des interactions existant entre les résidus et entre les résidus et le solvant. La connaissance de la structure primaire devrait, en principe, permettre de déterminer la structure tertiaire. En utilisant l'information tridimensionnelle donnée par la cristallographie pour un grand nombre de protéines, Chou et Fasman^{.57-.59} ont proposé une méthode empirique pour prévoir la formation de structures secondaires en hélices α , en

feuillets β et en coudes β au sein des protéines. La combinaison de la séquence des acides aminés et de l'information structurale tridimensionnelle permet également la prévision de l'emplacement des modifications pouvant se produire après transcription.

Dans la discussion suivante, on fera la distinction entre la conformation aléatoire et les structures désordonnées. En effet, presque toutes les protéines contiennent des structures désordonnées dont la conformation est fixe et correspond à des angles de valence, Ψ et ϕ , donnés. Par contre, lorsque la protéine adopte une conformation aléatoire ces angles peuvent fluctuer rapidement bien que restant, en moyenne, assez voisins de ceux d'une conformation β étendue.

La caséine β est la plus hydrophobe de toutes les caséines. Elle se compose de 209 résidus. A titre indicatif, la structure primaire de la caséine βA^2 est donnée dans la figure.I-1. Le domaine fortement chargé est clairement séparé du grand domaine hydrophobe du terminal C. La partie terminale N comprenant les 21 premiers résidus porte une charge totale négative d'environ 12 unités à pH 6.6, tandis que la charge totale du domaine hydrophobe est nulle. Ceci confère à cette molécule un caractère amphiphile.

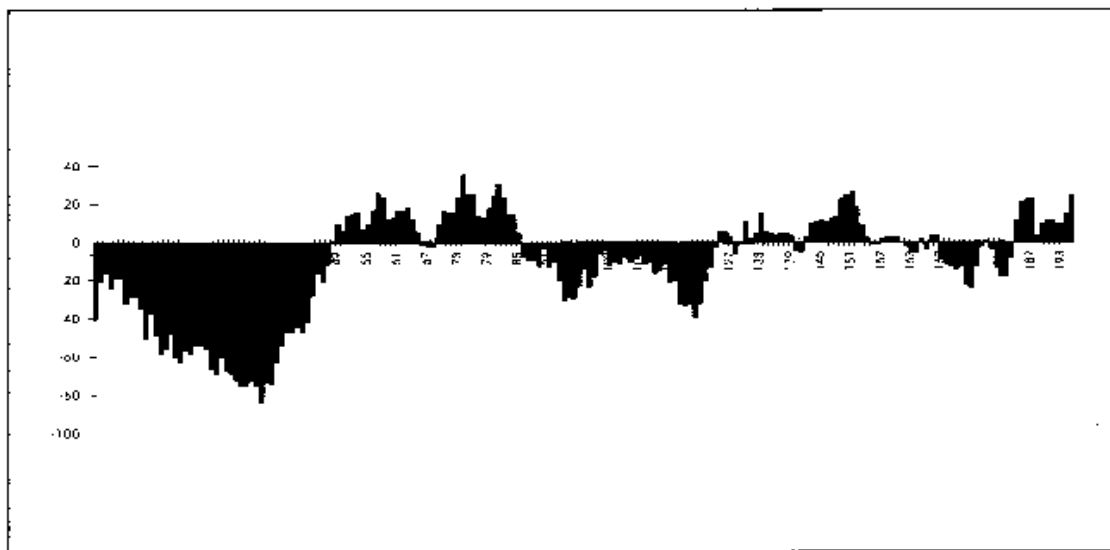
Comme le montre la figure. I-2, le domaine hydrophile correspond, environ, au premier quart de la chaîne situé du côté du terminal N. Le reste est globalement hydrophobe. Ce domaine hydrophobe se caractérise également par une très forte concentration ($\cong 0.17\%$) en résidus prolyls qui limitent le nombre de conformations accessible à la chaîne polypeptidique.

A cause de leur caractère apolaire, il est peu probable que les résidus du domaine hydrophobe soient complètement hydratés comme cela se produit pour une protéine totalement dénaturée qui adopte une conformation aléatoire. En raison de ses propriétés physico-chimiques qui sont tout à fait différentes de celles des protéines globulaires, la structure de la caséine β a fait l'objet de nombreuses études (voir la discussion ci-dessous) et de polémiques. En utilisant la méthode d'analyse de Chou et Fasman,⁵⁷⁻⁵⁹ il a été conclu que la caséine β contient 10% d'hélices α , 13% de feuillets β et 77% de structure désordonnée.⁶⁰ Aucune prévision n'a été faite concernant la quantité de coudes β . Cependant, elle pourrait être significative puisque les résidus prolyls sont très fréquents dans cette protéine.⁶¹ Le

domaine hydrophobe contiendrait probablement certains éléments de structure secondaire : hélices α pour les séquences (97-103) et (138-146) et feuillets β pour les séquences (52-60), (77-87), et (187-195). L'image qui semble donc émerger de la séquence de la caséine β est celle d'une molécule amphiphile avec une stabilité structurale marginale, puisque le comportement du domaine polaire pourrait s'approcher de celui d'une chaîne aléatoire.

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-SerP-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Gln-Pro-Phe-Thr-Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Pro-Leu-Leu-Leu-Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys-Ala-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val.

Figure. I-1. Structure primaire de la caséine βA^2 .⁶² Les acides aminés en gras sont ceux qui sont hydrophiles selon l'échelle d'hydrophobie de Levitt.⁶³



3.2. Propriétés physiques de la caséine β

3.2.1 Monomère

Les interactions hydrophobes jouent apparemment un rôle très important dans l'association des caséines β . Dans l'eau légère, cette protéine est sous forme monomérique à

des températures proches de 0°C et à des concentrations suffisamment faibles. Dans ces conditions le comportement hydrodynamique des monomères de caséine β se distingue de celui des autres caséines. Il est très semblable à celui d'une chaîne aléatoire. La valeur du rayon de Stokes, $R_S = 37 \text{ \AA}$, déterminée par chromatographie sur gel est en accord avec celles obtenues par les mesures de sédimentation et de viscosité.^{.64} Si la molécule était globulaire, de telles valeurs ne seraient obtenues que si sa forme était celle d'un ellipsoïde de révolution allongé de rapport axial égal à 12, environ. D'autre part des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles donnent un rayon de giration, $R_g = 46 \text{ \AA}$, qui correspond à celui d'une tige de presque 160 \AA de longueur.^{.65} Une telle asymétrie n'est pas conforme à plusieurs autres observations, dont la microscopie électronique qui indique une forme essentiellement sphérique.^{.66} En conséquence, une structure plus flexible doit être envisagée. Pour expliquer les résultats précédents, il a été suggéré que la solvation pouvait être très élevée et atteindre environ 6 à 8 g d'eau par gramme de protéine^{.64}, c'est à dire 20 à 30 fois plus que pour la plupart des protéines.

Cependant, comme nous le verrons au Chapitre III, une conformation de chaîne aléatoire idéale donnerait un rayon de giration d'environ 51 \AA . Une telle valeur est légèrement plus grande que la valeur expérimentale donnée précédemment. Par conséquent, on pourrait conclure que la molécule, bien que très déstructurée, contienne quelques éléments de structure secondaire. Swaisgood a suggéré la possibilité de formation d'une structure plus compacte à température élevée, les interactions hydrophobes entre les segments de structures secondaires du domaine hydrophobe devenant plus importantes.^{.62} Cet argument est étayé par plusieurs résultats expérimentaux, dont les dépendances en température de la viscosité et du rayon de Stokes mesuré par chromatographie sur gel.

Les monomères de caséine β peuvent aussi être étudiés dans l'état fortement dénaturé, en présence de 6 M de chlorure de guanidinium (GdmCl). Les propriétés hydrodynamiques de la protéine sont alors quasiment identiques à celles du monomère natif.^{.62} Comme nous le verrons dans le Chapitre III, dans de telles conditions la protéine est totalement dépliée. Ceci suggère fortement que le monomère natif adopte une conformation très proche de celle d'une chaîne aléatoire. Bien qu'assez imprécis, les résultats de mesures de diffusion de neutrons aux petits angles réalisés sur une solution de caséine β très peu concentrée tendent à confirmer ce fait.^{.31}

3.2.2 Micelles

La caséine β forme des micelles dont la taille dépend très fortement de la concentration et de la température.³⁰⁻³² Berry et Creamer⁶⁷ et Holt⁶⁸ ont montré que cette protéine se comporte comme un tensioactif constituée d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe. Ceci est en parfait accord avec la discussion précédente. Au-dessus de la concentration micellaire critique, la caséine β forme des micelles sphériques analogues à celles que produisent habituellement les tensioactifs.⁶⁹ Par des mesures de diffusion de neutrons et de lumière, Thurn et al.⁷⁰ ont conclu que les micelles de caséine β présentaient une structure sphérique analogue à celle d'une structure en étoile. Par la suite, des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles ont amené Kajiwara et al.⁷¹ à prétendre que ces micelles avaient une forme elliptique. Plus récemment Leclerc et al.^{31,32} ont montré à l'aide de la diffusion de neutrons aux petits angles que les micelles sont sphériques et interagissent de manière attractive ou répulsive selon la concentration. Cependant les changements de comportement des spectres de diffusion en fonction du vecteur de diffusion ne sont pas localisés conformément à ceux des polymères en étoile. Les micelles sont constituées d'un cœur hydrophobe assez dense entouré d'une couronne plus tenue. Des résultats obtenus à l'ILL (rapport annuel 1997) ont montré par diffusion des neutrons aux petits angles d'une solution de "nanocluster" et par la variation de contraste (D_2O/H_2O) dans le solvant, que le rayon de giration obtenu par l'approximation de Guinier est faible pour un contraste positif où le phosphate domine et est augmenté à contraste négatif où la protéine (caséine) domine. A partir de ces résultats, ils ont suggéré un modèle d'une particule de "nanocluster" qui montre un cœur de phosphate de calcium entouré par une couronne de phosphoprotéine.

Les expériences précédentes ont montré que dans l'eau lourde à 4°C la concentration micellaire critique (CMC) est voisine de 1 mg/ml.^{31,32} Il est donc très difficile de déterminer, avec une précision suffisante, la structure des monomères dans l'eau lourde.³¹ La présence dans la solution d'un agent dénaturant, comme le chlorure de guanidinium (GdmCl), augmente de façon significative la CMC. Des résultats préliminaires ont montré qu'elle est supérieure à 5 mg/ml après ajout de 1 M de GdmCl et qu'elle continue de croître avec la concentration de dénaturant. Dans ces conditions, il devient possible de caractériser la structure du monomère de caséine β , ainsi que d'étudier le processus de formation de micelles constituées de quelques molécules seulement.^{31,32}

3.2.3 Propriétés interfaciales

Le mécanisme d'adsorption des protéines a été souvent étudié à l'interface air-liquide. Par exemple dans le cas d'une protéine globulaire soluble telle que la sérum albumine bovine, l'adsorption à l'interface air/liquide commence par une étape de diffusion,⁷² suivie d'un dépliement partiel des chaînes à l'interface⁷³⁻⁷⁹. Ce mécanisme est plus simple dans le cas de la caséine β dont la structure en solution est flexible et analogue à celle d'une protéine globulaire dépliée⁶². En fait, il semble qu'un nombre important de proline dans sa chaîne polypeptidique impose à la protéine une structure ouverte au lieu d'une structure globulaire ou d'un molten-globule⁸⁰. Lorsque la caséine β s'adsorbe à l'interface, le dépliement des chaînes (ou changement de conformation) est réduit par rapport à celui d'une protéine globulaire. Ses propriétés de surface ont été étudiées depuis plus de vingt ans^{23,25,29,81-86}. La concentration de surface, la pression de surface, le module dilatationnel et le profil de concentration de ses couches d'adsorption sont maintenant assez bien connus. Un modèle de polymère a été récemment développé pour décrire les propriétés de surface d'une protéine se comportant comme un copolymère multibloc, c'est à dire un polymère avec des blocs hydrophiles et des blocs hydrophobes dans un ordre alterné⁸⁷. Cette approche n'est possible que si la molécule adsorbée se comporte comme un polymère à l'interface, c'est à dire que les blocs hydrophiles en solution soient sous forme de chaînes à trois dimensions et les blocs hydrophobes soient sous forme de chaînes bidimensionnelles.

La confrontation de ce modèle avec l'expérience devrait permettre de préciser certains éléments de la conformation des protéines adsorbées. En effet, les chaînes polypeptidiques s'interagissent fortement avec elles-mêmes par des liaisons hydrogènes, par exemple dans les structures en hélices α et en feuillets- β ⁸⁸ ou par des interactions hydrophobes⁸⁹. Afin de vérifier si quelques interactions résiduelles de la chaîne polypeptidique sont impliquées significativement dans la structure de la molécule adsorbée, ce travail a été entrepris pour comparer les propriétés des couches d'adsorption de la caséine β formée à l'interface en présence et absence d'un dénaturant, le chlorure de guanidinium (GdmCl). A forte concentration volumique, ce composé déplie complètement la plupart des protéines, qui, par conséquent, peuvent avoir des comportements de polymères plus ou moins gonflés par le solvant.^{39, 90-95}

4. ADSORPTION DE COPOLYMERES MULTIBLOCS

4.1. Modèle de copolymère multibloc

Puisque la séquence de la caséine β présente des zones plutôt hydrophiles et des zones plutôt hydrophobes nous nous efforcerons d'évaluer dans quelle mesure son comportement peut être modéliser par celui d'un copolymère multibloc nous présentons ci dessous le modèle théorique⁸⁷.

Dans la théorie mentionnée ci-dessous, le polymère se compose de blocs hydrophobes avec Z_A monomères et de blocs hydrophiles avec Z_B monomères. On définit α tel que : $\alpha = Z_A/Z_B$. Les monomères de séquences A et B ont la même taille, a . On suppose que les jonctions entre les blocs hydrophiles et hydrophobes sont strictement localisées dans le plan de l'interface et que les blocs ne traversent pas l'interface. A l'adsorption, le polymère adopte une conformation où les séquences hydrophobes forment des "galettes" à deux dimensions en contact avec le gaz et avec le liquide (fig.I-4). De l'autre côté, les séquences hydrophiles forment des pelotes aléatoires tridimensionnelles dans la phase liquide. Les conformations de ces "galettes" et des pelotes aléatoires sont définies comme des marches auto-évitantes et sont caractérisées par un rayon dans un espace tridimensionnel ou par un rayon, R , et une épaisseur dans un espace bidimensionnel. Une telle définition implique que chaque bloc a une structure fractale où la dimension fractale (D) est l'inverse de l'exposant de Flory, ν :

$$R \cong aZ^\nu \quad (\text{I-1})$$

$$D \cong 1/\nu \quad (\text{I-2})$$

où R est le rayon du bloc, a , la taille d'un monomère (unité statistique) et Z le nombre de monomères dans le bloc. Le signe \cong , signifie que tous les coefficients numériques sont ignorés.

4.1.1. STRUCTURE DE LA COUCHE INTERFACIALE DANS DIFFERENTS REGIMES

4.1.1.1. Molécule isolée

La conformation d'une chaîne multibloc isolée à l'interface air/liquide est définie pour des séquences A et B à volume exclu (condition de bon solvant pour la chaîne sous forme de pelote tridimensionnelle). La séquence A (galette) dans le plan de l'interface "côté gaz" et est définie :

$$r_{A||} \cong Z_A^{3/4} a \quad (I-3)$$

et
$$r_{A\perp} \cong a \quad (I-4)$$

La séquence B en solution dans le liquide (conformation locale 3D, "en pelote") est définie par:

$$r_{B||} \cong r_{B\perp} \cong Z_B^{3/5} a \quad (I-5)$$

Les exposants de Z_A et Z_B sont les exposants de Flory pour une chaîne de polymère à volume exclu et, respectivement, dans un espace bidimensionnel ou tridimensionnel.

Une molécule isolée, constitue un enchaînement de N diblocs de $Z_A + Z_B$ monomères a une unité statistique égale ou plus grand des rayons $r_{A||}$ ou $r_{B||}$. Son rayon de Flory, dans le cas d'une chaîne à volume exclu est :

$$R_{||} = r_{A||} N^{3/4} \quad (\text{si } r_{A||} > r_{B||} \text{ ou } \alpha < Z_B^{-1/5}) \quad (I-6)$$

$$R_{||} = r_{B||} N^{3/4} \quad (\text{si } r_{A||} < r_{B||} \text{ ou } \alpha < Z_B^{-1/5}) \quad (I-7)$$

Son épaisseur est :

$$R_{\perp} = r_{B\perp} + r_{A\perp} \quad (I-8)$$

4.1.1.2. Régime dilué

Les molécules sont à une concentration telle que la distance entre leurs centres est supérieure à $R_{//}$ c'est à dire à une concentration de surface en monomères, Γ , inférieure à Γ_{pol}^* tel que :

$$\Gamma_{pol}^* \cong \frac{N(Z_A + Z_B)}{R_{//}}$$

soit :

$$\Gamma_{pol}^* \cong N^{1/2} Z_A^{-1/2} (1+\alpha) \alpha^{-1} a^{-2} \quad \text{si } \alpha > Z_B^{-1/5} \quad (I-9)$$

$$\Gamma_{pol}^* \cong N^{1/2} Z_A^{-1/5} (1+\alpha) \alpha^{-1/5} a^{-2} \quad \text{si } \alpha < Z_B^{-1/5} \quad (I-10)$$

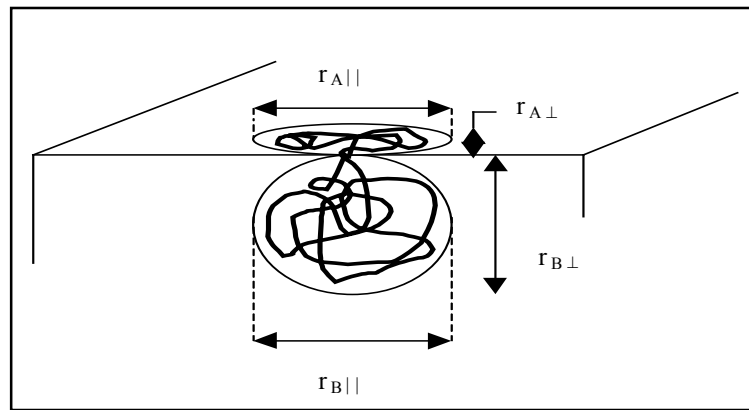


Figure.I-4 : représentation d'un dibloc de copolymère adsorbé à une interface gaz- liquide.

Quand la concentration de surface augmente, les chaînes de polymère s'enchevêtrent. Les molécules ne peuvent plus être envisagées comme des blocs isolés. L'interface entre alors successivement dans les régimes semi-dilués (figures. I-5 et I-6), qui peuvent être définis en fonction du rapport, α et de la concentration de surface des multiblocs adsorbés.

4.1.1.3. PREMIER REGIME SEMI-DILUE

Quand la concentration de surface atteint Γ_{pol}^* les molécules commencent à s'enchevêtrer, l'interface entre dans le régime semi-dilué du polymère ($\Gamma > \Gamma_{pol}^*$). Ce régime semi-dilué ne change pas de nature aussi longtemps que les unités statistiques ont

suffisamment de place pour ne pas se recouvrir. Ce recouvrement correspond à la concentration de surface dans chaque couche de monomères A ou B, Γ_{bloc}^* définie par :

$$\Gamma_{bloc}^* \cong \frac{Z_A}{r_{A//}^2} \quad \text{si } \alpha > Z_B^{-1/5} \quad (\text{I-11})$$

$$\Gamma_{bloc}^* \cong \frac{Z_B}{r_{B//}^2} \quad \text{si } \alpha < Z_B^{-1/5} \quad (\text{I-12})$$

DANS LE PREMIER REGIME SEMI-DILUE $\Gamma_{pol}^* < \Gamma < \Gamma_{bloc}^*$

À cette concentration de surface, la longueur de corrélation, ξ , (distance entre les objets non-corrélés) est le rayon du plus grand bloc parallèle au plan de l'interface:

$$\xi = \xi_{pol}^* \cong R_{//} \quad (\text{I-13})$$

La longueur de corrélation ξ , peut être calculée en utilisant des arguments de loi d'échelle², en fonction de la concentration réduite Γ/Γ_{pol}^* :

$$\xi \cong \xi_{pol}^* (\Gamma/\Gamma_{pol}^*)^m \quad (\text{I-14})$$

On note en particulier que dans cette relation, $\xi \cong \xi_{pol}^*$ lorsque $\Gamma = \Gamma_{pol}^*$, quel que soit m qui reste à déterminer. La valeur de m est définie par le fait que ξ , est une propriété locale qui est donc indépendante de la taille du bloc A. En d'autres termes, la valeur de m est déterminée à partir de la condition que l'expression de ξ est indépendante de Z_A (l'exposant de Z_A est zéro). A partir des équations (I-10) et (I-13) nous pouvons déduire la nouvelle expression de ξ :

$$\xi \cong a^{-2} (1 + 1/\alpha)^{3/2} \Gamma^{-3/2} \quad (\text{I-15})$$

4.1.1.4. Régimes au delà de la concentration de recouvrement des blocs

Au delà de la concentration de recouvrement des blocs, différents régimes apparaissent successivement de chaque côté de l'interface. Nous les analysons d'abord de chaque côté.

Leur combinaison permet ensuite de définir les régimes en fonction de la concentration de surface totale de l'interface.

4.1.1.4.1. Régimes du côté gaz de l'interface.

- Régime semi-dilué à deux dimensions :

Ce régime commence à concentration de recouvrement des blocks (Γ_{pan}^*) définis par l'équation suivante :

$$\Gamma_{pan}^* = (1 + 1/\alpha) Z_A / r_{A//}^2, \quad (I-16)$$

et utilisant l'équation ($r_{A//} \cong a Z_A^{3/4}$)

$$\Gamma_{pan}^* = a^{-2} (1 + 1/\alpha) Z_A^{-1/2}, \quad (I-17)$$

Ce régime est caractérisé par une longueur de corrélation de deux dimensions, qui peut être calculée comme dans l'équation (I-11) mais où $r_{A//}$ remplace $R_{//}$, Γ_{pan}^* remplace Γ_{pol}^* et ξ_A est indépendante de Z_A . On obtient :

$$\xi_A \cong a^{-2} (1 + 1/\alpha)^{3/2} \Gamma^{-3/2} \quad (I-18)$$

Quand cette longueur de corrélation devient de l'ordre de la taille a des monomères, le côté A de l'interface entre dans un régime quasi fondu où l'épaisseur de la couche est plus grand que la taille d'un monomère simple.

- RÉGIME DU QUASI-FONDU

Les séquences de polymère sont éjectées à l'extérieur du plan vers la phase gazeuse. La structure de cette couche devrait être presque un fondu puisqu'il n'y a aucun solvant à l'intérieure. La concentration de recouvrement Γ_{pan}^{**} où commence le régime est définie par $\xi_A \cong a$, où ξ_A est exprimé à partir de l'équation (I-18),

$$a^{-2}(1+1/\alpha)^{3/2}\Gamma^{-3/2} \cong a \quad (I-19)$$

d'où :

$$\Gamma_{pan}^{**} \cong a^{-2}(1+1/\alpha). \quad (I-20)$$

Dans ce régime, la longueur de corrélation ne peut pas décroître en dessous de la taille d'un monomère. Ainsi, le régime est caractérisé par la constante de longueur de corrélation :

$$\xi_A \cong a \quad (I-21)$$

Cependant, les séquences peuvent gagner de l'énergie sous forme d'élasticité entropique quand l'épaisseur du fondu est suffisante.

- QUASI-BROSSES DU QUASI-FONDU

Quand l'épaisseur de la phase fondue, R_{\perp} devient plus grand que le rayon d'une chaîne idéale $R_0 \cong aZ_A^{1/2}$, chaque séquence gagne de l'énergie et la couche entre dans le régime quasi-brosse. R_{\perp} est le rapport entre le volume de la séquence et l'aire d'une molécule dans le plan de l'interface :

$$R_{\perp} \cong a^3 Z_A / ((Z_A + Z_B) / \Gamma) \cong a^3 (1 + 1/\alpha)^{-1} \Gamma \quad (I-22)$$

La concentration de surface à la transition, Γ_{melt} , où les chaînes dans la phase fondue deviennent étirées, correspond à la condition $R_0 = R_{\perp}$:

$$\Gamma_{melt} \cong a^{-2} \alpha^{-1/2} (1 + \alpha) Z_B^{1/2} \quad (I-23)$$

4.1.1.4.2. REGIMES DU COTE LIQUIDE DE L'INTERFACE

- Régime semi-dilué

La concentration de recouvrement des blocs (Γ_{bloc}^*) est définie par :

$$\Gamma_{bloc}^* \cong (1 + \alpha) Z_B / r_{B//}^2 \quad (I-24)$$

et utilisant l'équation (I-5),
$$\Gamma_{bloc}^* \cong a^{-2} (1 + \alpha) Z_B^{-1/5} \quad (I-25)$$

Au-delà de cette concentration, les séquences commencent à s'étirer dans la direction perpendiculaire au plan de l'interface et forment les structures de quasi-brosse (fig I-6).

- EPAISSEUR DE LA COUCHE DU COTE LIQUIDE DE L'INTERFACE

Au-delà de, Γ_{bloc}^* le comportement de la couche B devient localement à trois dimensions : la longueur de corrélation est plus petite que l'épaisseur de la couche. Ainsi, la quantité pertinente dans la couche est la concentration volumique C , qui est reliée à la concentration de surface à travers

$$C_B \cong \Gamma_B / R_{B\perp} \quad (I-26)$$

L'épaisseur de la couche est peut être calculée à partir de la loi d'échelle :

$$R_{B\perp} \cong r_{B\perp} (C_B / C_B^*)^m \quad (I-27)$$

où $R_{B\perp}$ est la longueur des éléments de la brosse (l'épaisseur de la couche côté liquide), $r_{B\perp}$ est défini par l'équation (I-5), C_B et C_B^* sont les concentrations volumiques dans tout le régime en quasi brosse et à la concentration de recouvrement, Γ_{bloc}^* , et m est un exposant à déterminer.

D'après (eq I-26), on peut écrire pour C_B^* :

$$C_B^* = \Gamma_{bloc}^* / ((1 + \alpha) r_{B\perp}) \cong a^{-3} Z_B^{-4/5} \quad (I-28)$$

Maintenant, l'exposant, m , peut être calculé, on supposant que $R_{B\perp}$ est proportionnel à Z_B .^{.96} Nous découvrons, $m = \frac{1}{2}$. D'où :

$$R_{B\perp} \cong a^{5/2} Z_B C_B^{1/2} \quad (I-29)$$

En tenant compte de l'équation (I-26)

$$R_{B\perp} \cong a^{5/3} (1 + \alpha)^{-1/3} Z_B^{2/3} \Gamma^{1/3} \quad (I-30)$$

Cela définit l'épaisseur de la couche (brosse).

Il faut mentionner ici, que le calcul de m est basé sur la condition, $R_{B\perp} \sim Z_B$ qui est dans l'équation (I-27). En effet, combinant (I-26) et (I-29), on trouve

$$\Gamma_B \cong Z_B C_B^{3/2} a^{5/2} \quad (\text{I-31})$$

Bien que la signification physique de l'équation (I-30) soit moins évidente que celle de l'équation (I-29), l'expression des quantités physiques utilisant la concentration de surface est préférée dans ce travail, puisque ce paramètre est plus aisément mesuré expérimentalement que la concentration de volume dans les couches adsorbées. Dans ce régime, la longueur de corrélation à 3 dimensions dans la couche en quasi-brosse, ξ_B , peut être calculée comme l'expression suivante

$$\xi_B \cong \xi_B^* (C_B / C_B^*)^m, \quad (\text{I-32})$$

où ξ_B^* , est la longueur de corrélation dans la couche B à la fin du régime avec une épaisseur, $r_{B\perp}$, constante et les autres quantités sont définies comme pour l'équation (I.27). La condition que ξ_B doit être indépendante de Z_B impose $m = -\frac{3}{4}$. On obtient :

$$\xi_B \cong C_B^{-3/4} a^{-5/4} \cong \Gamma^{-1/2} Z_B^{1/2} (1 + \alpha)^{1/2}. \quad (\text{I.33})$$

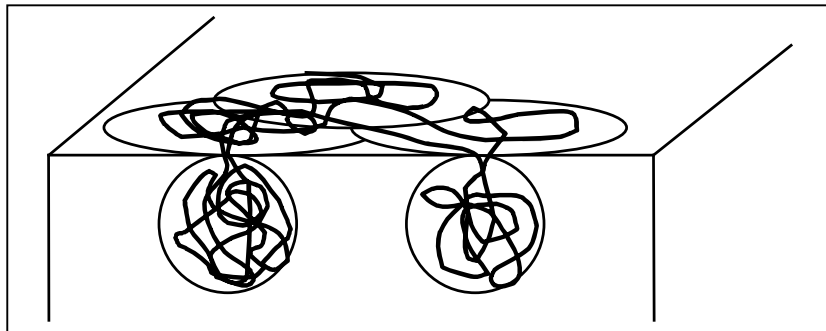


Figure.I-5 Régime Semi-dilué de la couche interfaciale, quand $r_{A||} > r_{B||}$. Les propriétés de l'interface sont dominées par le comportement local à deux dimensions.

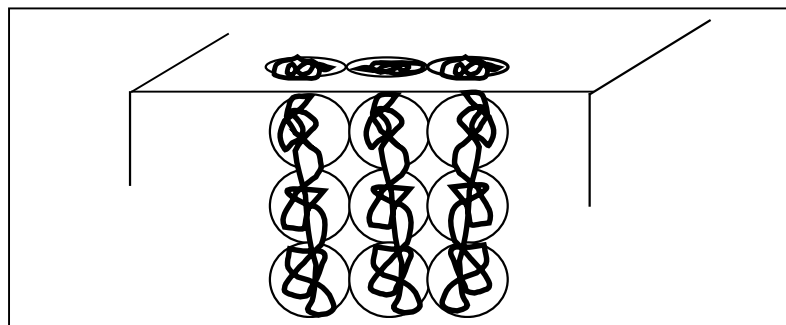


Figure.I-6: Régime Semi-dilué de la couche interfaciale, quand $r_{A||} < r_{B||}$. Les propriétés de l'interface sont dominées par le comportement local à trois dimensions des "quasi-brosses" dans le liquide.

4.2.2. DIAGRAMME DE PHASE

Maintenant, les régimes sont définis de chaque côté de l'interface en fonction de Γ , le diagramme de phase peut être tracé en fonction de α et de Γ , ou plus précisément en fonction de la concentration de surface réduite $G = \Gamma/\Gamma_{pol}^*$ pour la simplicité (fig.I-7). L'interface entre dans le régime semi-dilué du polymère quand $\Gamma = \Gamma_{pol}^*$ (Eq. (I-9, I-10)), où $G = 1$. On devrait noter que c'est une représentation graphique très commode puisque Γ_{pol}^* change sa valeur selon la condition, $r_{A//} \geq r_{B//}$ ou $r_{A//} \leq r_{B//}$. Le "crossover" entre ces deux situations se produit à:

$$\alpha = Z_B^{-1/5} \quad (I-34)$$

Le diagramme de phase entier est déterminé en divisant le plan (Γ, α) ou (G, α) par les lignes définissant les "crossover" entre les divers régimes des deux côtés de l'interface: définis par les équations (I-16), (I-20), (I-23) et (I-25).

Les intersections entre ces lignes définissent en particulier les coordonnées dans le diagramme de phase. L'intersection à $\alpha = Z_B^{-1}$ est hors de la portée du problème de polymère puisqu'elle correspond à $Z_A = 1$. L'intersection à $\alpha = Z_B^{7/5}$ (n'est pas visible dans la fig.I-7) correspond à un polymère très asymétrique et ainsi très hydrophobe et n'est pas considérée en détail dans cette étude.

4.2.2.1. PRESSION DE SURFACE DANS LES DIFFERENTS REGIMES

Le diagramme de phase des régimes des deux côtés de l'interface montre que lorsque la concentration de surface augmente, les changements de régime des blocs du polymère ne peuvent s'opérer que selon trois modes différents correspondant respectivement aux valeurs de α suivantes (fig. I-7) :

$$\begin{aligned} \alpha < Z_B^{-1/5} & : \text{mode I} \\ Z_B^{-1/5} < \alpha < Z_B^{1/5} & : \text{mode II} \\ \alpha > Z_B^{1/5} & : \text{mode III} \end{aligned} \quad (I-35)$$

À partir de l'interface diluée en augmentant la concentration de surface (fig. I-8), la couche interfaciale montre d'abord un régime gazeux, puis un régime semi-dilué d'un côté de l'interface, et finalement des régimes avec des interactions significatives entre les segments de polymère des deux côtés de l'interface. En premier lieu, la loi des gaz parfaits donne une bonne approximation de la situation, puis, le côté de l'interface dans le régime semi-dilué impose son comportement, et finalement les énergies de surface des deux côtés doivent être comparées pour déterminer la contribution principale à la pression de surface. Comme précisé dans les sections précédente (4.1.1.3. et 4.1.1.4.), une saturation de l'interface peut se produire dans plusieurs régions du diagramme de phase lorsque l'énergie des molécules adsorbées est aussi élevée que celle des molécules formant des micelles en solution et peut définir la valeur finale de la pression de surface. Dans la section actuelle, cette dernière possibilité n'est pas et tous les isothermes possibles pourraient être décrits par une combinaison des résultats de cette section avec celles de la précédente.

- **Régimes gazeux**

Dans le régime dilué, les chaînes de polymère sont adsorbées les unes loin des autres sur la surface. Ces chaînes ne se superposent pas et contribuent à la pression de surface en tant qu'objets différents,

$$\Pi \cong k_B T \Gamma / (N(Z_A + Z_B)) \quad (I-36)$$

où k_B est la constante de Boltzmann et T est la température absolue.

- **Régimes semi-dilués**

Quand la concentration de surface augmente au-delà de la première concentration de recouvrement, la pression de surface est décrite dans chaque couche homogène en fonction de la longueur de corrélation :

$$\Pi \cong k_B T (1/\xi^2) \quad (I-37)$$

Il est clair d'après l'équation (I-37), que le côté de l'interface avec la longueur de corrélation la plus faible impose son comportement à l'interface entière. Ainsi dans les

régimes où les blocs solvophobes forment une couche d'épaisseur constante caractérisée par un régime semi-dilué à deux dimensions. La pression de surface, équation (I-37), calculée en utilisant la valeur de l'équation I-16 est une fonction du troisième degré de la concentration de surface:

$$\Pi \cong k_B T \Gamma^3 a^4 (1 + 1/\alpha)^{-3}. \quad (I-38)$$

Dans les régimes où les blocs solvophiles tridimensionnels forment des quasi-brosses, la concentration de cette couche à la pression de surface obtenue à partir des équations (I-37) et (I-33) est proportionnelle à la concentration de surface:

$$\Pi \cong k_B T \Gamma Z_B^{-1} \quad (I-39)$$

- **Régimes Quasi fondu**

Dans le cas du quasi-fondu (régime localement tridimensionnel sur le côté gaz de l'interface), la longueur de corrélation est constante (Eq. I-33) et ainsi la pression de surface est aussi constante :

$$\Pi \cong k_B T a^{-1} \quad (I-40)$$

Les isothermes de la pression de surface pour les trois régions de la figure. I-7 sont représentées dans la figure .I-9.

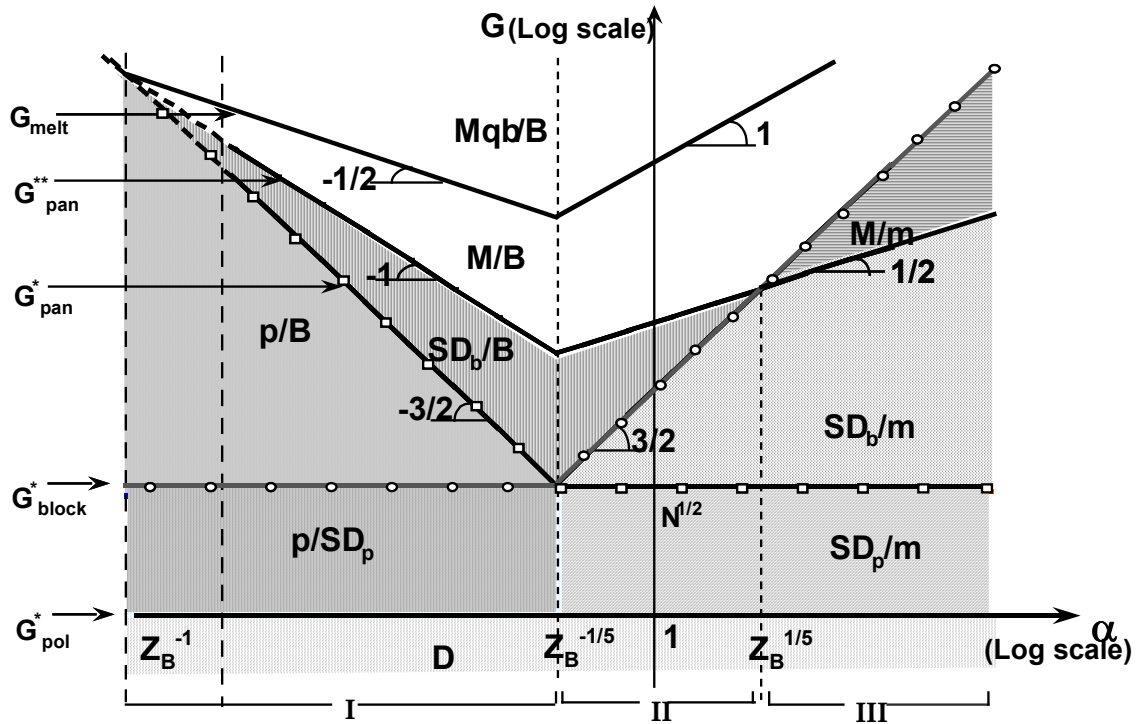


Figure (I-7) : Diagramme de phase des régimes apparaissant des deux côtés de l'interface gaz-liquide en fonction de la concentration de surface et du rapport α des séquences hydrophobe aux séquences hydrophile.

L'unité de l'axe vertical est la concentration de surface réduite $G = \Gamma / \Gamma_{pol}^*$ où Γ est la concentration de surface et Γ_{pol}^* est la concentration de surface de recouvrement entre le régime dilué (gazeux) et le premier régime de semi-dilué de l'interface. G_{pol}^* est la concentration de recouvrement des chaînes de polymère, G_{block}^* est la concentration de recouvrement des séquences B; G_{pan}^* est la concentration de recouvrement des séquences A; G_{pan}^{**} est la concentration de recouvrement des monomères du bloc A, G_{melt} est la concentration de surface de recouvrement à laquelle les blocs A commencent à s'étendre (référence .87).

Abréviations. D: régime dilué. Les autres régimes sont définis par les propriétés du polymère ou des deux blocs différents de chaque côté de l'interface.

Pour les blocs A du côté de gaz de l'interface, les régimes locaux sont comme suit. p: "pancakes" isolée, SD_p : chaîne de polymère à bidimension en régime semi-dilué (les unités statistiques sont les blocs A); SD_b : des blocs à bidimension en régime semi-dilué (les unités statistiques sont les monomères), M quasi-fondu; Mqb: quasi-brosse sont formées dans la phase.

Dans le cas des blocs de B du côté liquide de l'interface, les régimes ont été énumérés ensuite et peuvent se produire. m: champignons isolés; SD_p : chaîne de polymère à bidimension en régime semi-dilué (les unités statistiques sont les séquences du bloc B); B: quasi-brosse le régime est dans la phase liquide

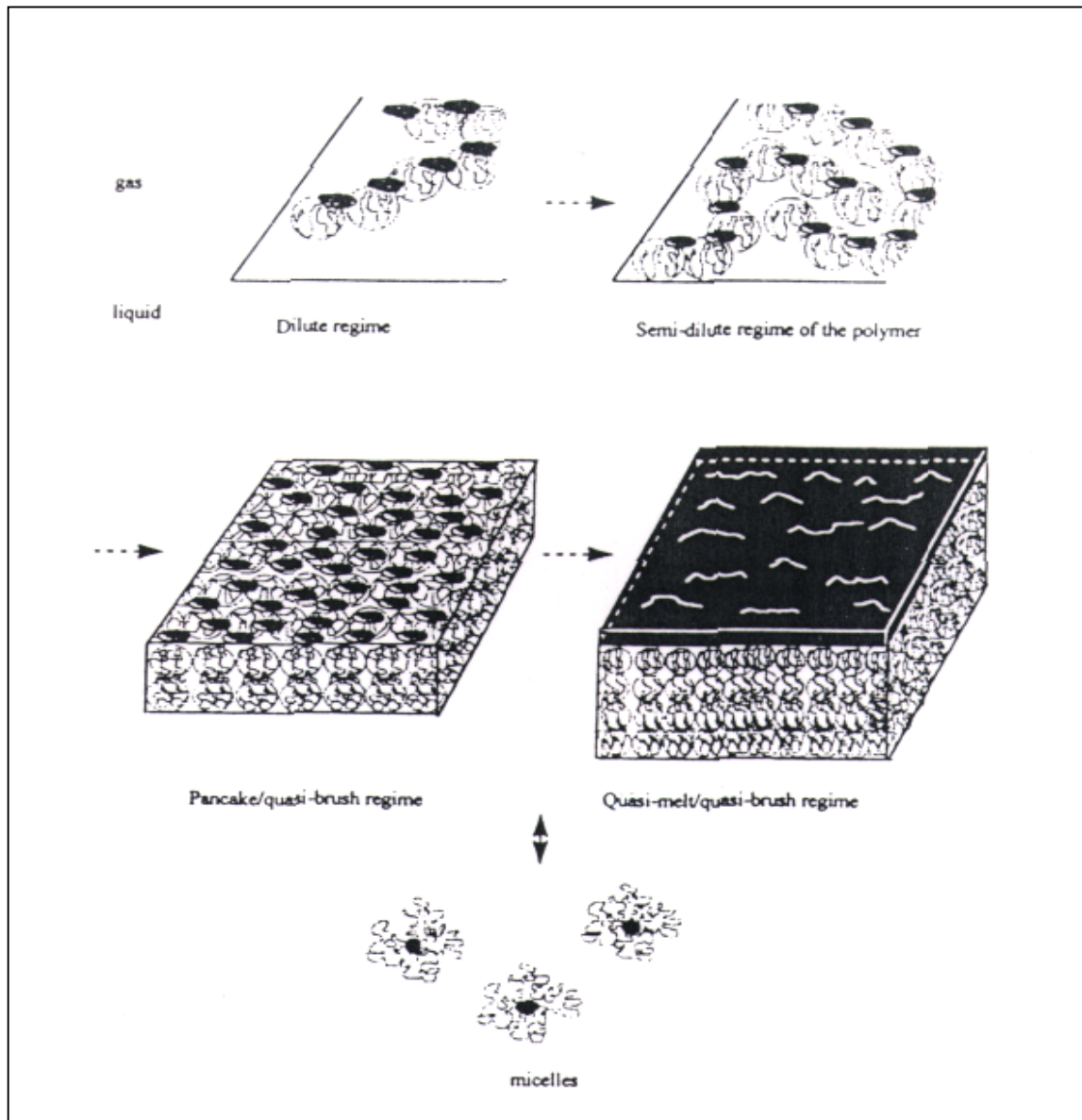


Figure. I-8 : *Quelques régimes d'interface gaz/liquide serrés par des molécules de polymère dans le cas $r_{A//} < r_{B//}$. Dans les images supérieures, les cercles représentent la conformation des blocs. Dans les images inférieures, et du côté du liquide, sont destinés pour représenter les "blobs" qui ont la taille d'une longueur de corrélation.*

4.2.3. Conformation des blocs isolés.

Jusqu'à présent, nous avons étudié le cas où les blocs de polymères ont la conformation de chaînes à volume exclu à 2 ou à 3 dimensions. On sait que les valeurs relatives des énergies d'interaction entre monomères ou entre monomères solvant modifient la

conformation des polymères, pouvant conduire à la conformation de chaîne écroulée (mauvais solvant), de chaîne idéale (solvant ou température θ) ou de chaîne étirée (fortes répulsions entre monomères).

Comme indiqué, ci-dessus, on peut exprimer la pression de surface pour les régimes dilués et semi dilués par :

$$\pi = k_B T \Gamma^y \quad (\text{I-41})$$

où y est l'exposant déterminé par des raisonnements de loi d'échelle et dépendant de la conformation des blocs isolés et du régime de l'interface. Nous avons donc calculé y pour les régimes semi-dilués des blocs à 2 et à 3 dimensions (tableau II-2). y , peut être liée à l'exposant de Flory, v_2 ^{2, 97, 98}, l'indice 2 c.-à-d. (dimension = 2):

$$y = \frac{2v_2}{2v_2 - 1} \quad (\text{I-42})$$

Le tableau suivant (II-2) présente la relation entre l'exposant v_2 et l'exposant Y à partir de l'équation. (I-42).

Conditions	v_2	v_3	y_2	y_3
Chaîne étirée	1	1	2	1
Bon solvant	3/4	3/5	3	1
Θ solvant	4/7	1/2	8	1
Mauvais solvant	1/2	1/3	∞	0

Tableau.II-2 : Valeurs calculées des exposants reliant la pression et la concentration de la surface.

Quand les blocs bidimensionnels imposent leur comportement à la couche interfaciale, y est égal, ou plus grand que, 3. Par contre quand les propriétés de l'interface sont dominées par des pelotes aléatoires tridimensionnelles forcées pour former le quasi brosse (ils se resserrent pour avoir une extension dans une direction perpendiculaire à l'interface), y égal à un, quoi que la dimension fractale des pelotes aléatoires dans le régime dilué. L'équation (I-41) prise

pour la pression de surface que si la concentration de surface Γ est exprimée comme une masse ou nombre de molécule par unité de surface.

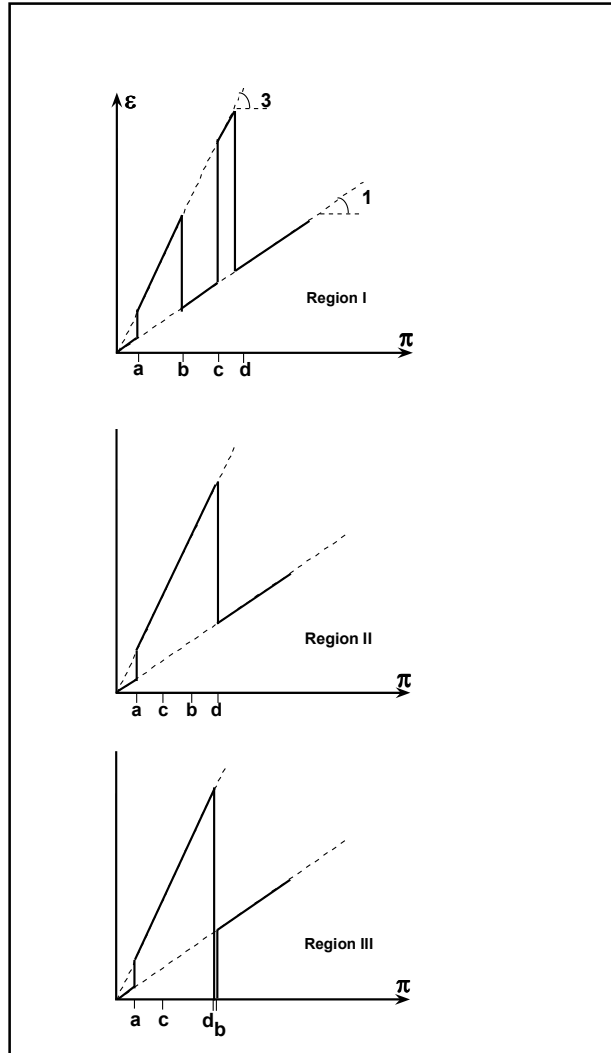


Figure.I-9 : Variations du module viscoélastique, ϵ , en fonction de la pression de surface, π , dans chacune des trois régions définies. Dans les figures précédentes. Les pentes des lignes dans I, II et III sont les valeurs de y obtenues par l'équation (I-15) ou (I-18) et sont les pentes des isothermes montrées dans la fig. 6 de la référence .87, pour les valeurs de pression surface correspondantes. Le régime dilué est observé, aux pressions de surface en dessous de 1 mN/m, n'est pas très significatif dans nos conditions expérimentales. On observe des changements de régime aux pressions de surface dénotées:

- (a) π_{pol}^* , au-delà du π_{pol}^* , les chaînes de polymère se superposent, (b) π_{block}^* , au-delà du π_{block}^* , les pelotes aléatoires des blocs B se superposent et entrent dans le régime semi-dilué quasi-brosse; (c) π_{pan}^* , au-delà de π_{pan}^* , les "pancakes" des blocs A se superposent, l'interface est dominée par le régime semi-dilué à deux dimensions; (d) π_{pan}^{**} , au-delà de π_{pan}^{**} la concentration de surface des blocs A est entre dans un quasi-fondu à trois dimensions.

4.2.3.1. MESURE DES PROPRIETES DES COUCHES D'ADSORPTION

La pression de surface est la différence entre la tension de surface du solvant pur γ_0 et celle d'une solution renfermant un tensioactif :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{I-43})$$

Le module viscoélastique, ε , est défini comme le rapport entre la variation de la tension de surface, $d\gamma$, et celle relative de l'aire de la surface de la bulle, $dA/A = d\ln(A)$ ⁹⁹ :

$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{d\ln(A)} \quad (\text{I-44})$$

Cette définition, a été proposée par Gibbs pour l'élasticité d'une surface occupée par des molécules de savon. Le paramètre ε prend différents noms, élasticité de Gibbs, élasticité de surface, module de compressibilité ou encore élasticité de la couche. Actuellement, on parle plutôt de module dilatationnel dans le cas plus général d'une surface ayant un comportement viscoélastique. Dans ce dernier cas, deux contributions peuvent être mesurées séparément. La déformation d'une surface est une combinaison d'une dilatation et d'un cisaillement. Il est possible de définir une élasticité et une viscosité de dilatation et de cisaillement. On suppose que l'interface est soumise à une déformation de faible amplitude et à une fréquence ν donnée. Le module viscoélastique ε peut s'écrire sous la forme d'un nombre complexe, dont la partie réelle est le coefficient d'élasticité ε_d et la partie imaginaire, le produit du coefficient de viscosité η_d , par la pulsation (ω):

$$\varepsilon = \varepsilon_d + i \omega \eta_d, \quad (\text{I-45})$$

cette expression peut être écrite en fonction de l'angle de déphasage ϕ :

$$\varepsilon = |\varepsilon| (\cos\phi + i\sin\phi), \quad (\text{I-46})$$

si $\phi = 0$, la couche interfaciale est purement élastique
si $\phi > 0$, la couche interfaciale est viscoélastique.

4.2.3.2. Relations entre le module dilatationnel et la pression de surface

Tenant compte des expressions du module viscoélastique (I-44) et de la pression de surface (I-43), l'adsorption et la désorption ne sont pas significatives pendant une oscillation :

$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{dLn(\Gamma)} \quad (I-47)$$

Γ est la concentration de surface et est définie comme le rapport m / A , où m est la masse de la protéine adsorbée supposée constante à l'interface d'aire A .

combinant les équations (I-41) et (I-47) donne :

$$\varepsilon = y \pi \quad (I-48)$$

ε en fonction de π est juste une transformation mathématique de l'équation d'état (I-41) puisque ε dans l'équation, (I-47) est une fonction dépend seulement de π et de Γ . Dans une expérience, il est plus commode de mesurer ε que de mesurer Γ et ainsi on peut plutôt utiliser l'équation (I-48) que (I-41) pour évaluer la cohérence entre la théorie et les données voir comment l'expérience est conforme à la théorie (fig. I-9).

5. OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif final de ce travail est de contribuer à évaluer l'effet de la conformation de la caséine- β et plus particulièrement des segments adsorbés sur ses propriétés de surface.

Pour parvenir à cet objectif, la conformation de la caséine en solution sera modifiée par le chlorure de guanidinium connu pour son pouvoir de dénaturer les protéines en solution et de les amener à un état de polymère gonflé par le solvant. La question qui se posera sera l'adsorption de la protéine en présence du dénaturant.

Il faudra alors pouvoir évaluer la conformation de la protéine adsorbée en fonction des propriétés du solvant, en espérant que les propriétés de celui-ci se répercutent du volume à

l'interface. Ces mesures devraient s'appuyer sur un modèle issu de la théorie statistique des polymères.

Si ces étapes sont franchies avec succès, on pourra effectivement évaluer l'effet d'un agent dénaturant sur la conformation de la molécule adsorbée et déterminer par comparaison des éléments de structure de la molécule en milieu non dénaturant.

La compréhension des lois régissant le repliement passant par une connaissance approfondie des états natifs et dénaturés des protéines, il nous a paru nécessaire de caractériser plus en détail les différentes conformations de la caséine β dans différents états dénaturés, d'un point de vue structural . Dans cette optique, nous avons eu recours à des techniques susceptibles de nous apporter un nouveau type d'informations : la diffusion des neutrons, la réflectivité des neutrons et la tensiométrie. Le deuxième chapitre de ce mémoire fournit les éléments de théorie permettant de comprendre la méthodologie de ces techniques, et explique quel type de renseignements elles peuvent apporter à l'étude d'un système semblable au nôtre.

Différents facteurs physico-chimiques ont été employés pour déstabiliser la caséine β . Le troisième chapitre a pour objectif de décrire la caséine- β , plus au moins fortement dénaturée par un agent, le chlorure de guanidinium. La diffusion de neutrons aux petits angles nous a permis d'apporter des informations relativement précises sur la caséine β complètement dépliée, un état en fin de compte très peu connu jusqu'à présent. En outre, La réflectivité de neutrons et la tensiométrie nous ont permis d'évaluer la conformation de la protéine adsorbée en fonction des propriétés du solvant. Ces mesures des couches d'adsorption s'appuient sur un modèle issu de la théorie des polymères.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Introduction

Les techniques de diffusion des neutrons, réflectivité de neutrons et du tensiomètre à bulle, jouent un rôle très important dans la détermination des propriétés structurales des milieux colloïdaux. Dans la littérature relativement peu d'articles s'attachent à présenter conjointement ces techniques et les méthodes utilisées pour analyser les résultats¹⁰⁰⁻¹⁰³. Dans ce chapitre, nous allons en donner les principes théoriques.

1. DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES

La diffusion élastique des neutrons aux petits angles (DNPA) permet de sonder la matière à des échelles de taille comprises entre quelques angströms et quelques centaines d'angströms. Cette technique est complémentaire des techniques de diffusion de rayons X et de la lumière. De plus, grâce à l'interaction particulière des neutrons avec la matière, le marquage isotopique permet, dans un mélange, de distinguer un diffuseur particulier parmi d'autres. Dans un milieu diffuseur quelconque, ce sont les variations et les fluctuations de densité de la matière qui provoquent la diffusion. Ces variations sont localisées aux interfaces alors que les fluctuations se produisent dans le volume. La diffusion des neutrons est donc essentielle pour l'étude des milieux présentant des interfaces, comme les solutions colloïdales ou les milieux poreux. En choisissant de manière appropriée les contrastes et la gamme de vecteurs de diffusion, cette technique permet d'obtenir différents types d'informations comme la taille des diffuseurs et leur structure interne, la quantité de matière liée à une surface ou présente dans une micelle, le profil de concentration d'une interface ou l'amplitude et l'étendue des corrélations de densité au sein d'un matériau, etc.

1.1. Principe de la D.N.P.A

Considérons un faisceau parallèle et monochromatique de neutrons de longueur d'onde λ traversant un échantillon. Ce faisceau peut être assimilé à une onde plane de vecteur d'onde incident \vec{k}_i . L'interaction entre les neutrons et les noyaux atomiques de l'échantillon provoque la diffusion des neutrons. Dans une direction faisant l'angle θ avec le faisceau incident, le vecteur d'onde de diffusion est \vec{k}_d . Le transfert de vecteur d'onde est donc

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_d \quad (\text{II-1})$$

et son module est

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}. \quad (\text{II-2})$$

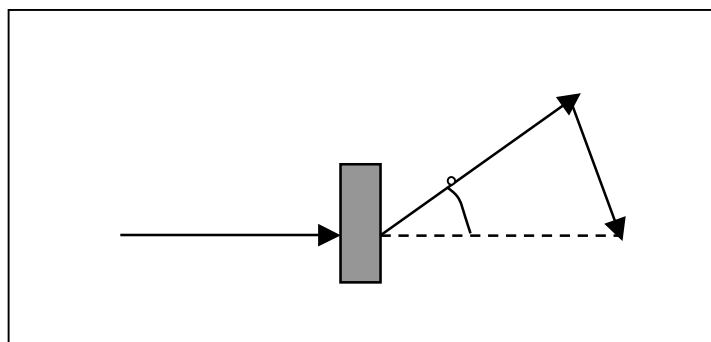


Figure II-1. Représentation de la diffusion de neutron par un échantillon.

1.2. Expression de l'intensité diffusée

1.2.1. Cas général

L'amplitude de diffusion cohérente d'un échantillon est :

$$a(\vec{q}) = \sum_i b_i \exp(i \vec{q} \cdot \vec{r}_i), \quad (\text{II-3})$$

où \vec{r}_i est la position du noyau atomique i dont la longueur de diffusion cohérente est b_i .

L'intensité diffusée de manière cohérente par unité d'angle solide et par unité de volume d'échantillon est donc :

$$I(\vec{q}) = \frac{1}{V} \langle |a(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{1}{V} \langle \sum_{i,j} b_i b_j \exp[i \vec{q} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)] \rangle \quad (\text{II-4})$$

où V est le volume diffusant. Les crochets indiquent la moyenne statistique. $I(\vec{q})$ est en fait une section efficace différentielle de diffusion par unité de volume et a la dimension de l'inverse du produit d'une longueur par un angle solide ($\text{cm}^{-1} \text{sr}^{-1}$). La forme du profile de diffusion, $I(\vec{q})$, donne des informations à une échelle spatiale de l'ordre de q^{-1} sur la structure de l'échantillon.

L'expression précédente peut être réécrite de la manière suivante :

$$I(\vec{q}) = \frac{1}{V} \left\langle \left| \int_V \rho(\vec{r}) e^{i \vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (\text{II-5})$$

où

$$\rho(\vec{r}) = \sum_i b_i \delta(\vec{r} - \vec{r}_i) \quad (\text{II-6})$$

est la densité locale de longueur de diffusion cohérente.

L'intensité totale des neutrons diffusés par un échantillon quelconque est la somme de deux termes : l'intensité cohérente, $I(q)$, dont l'expression générale vient d'être donnée et de l'intensité incohérente résultant du changement de l'état de spin des neutrons lors de leurs interactions avec le spin nucléaire des atomes diffuseurs. Le plus fort diffuseur incohérent est l'hydrogène. Aux petits angles, la diffusion incohérente reste indépendante de q . Elle peut donc être considérée comme un simple bruit de fond constant dont le niveau peut être estimé à partir de la composition atomique de l'échantillon.

1.2.2. Solutions colloïdales idéales

Dans un système constitué de gros objets en solution très diluée dans un solvant constitué de petites molécules, ces objets produisent un excès d'intensité diffusée

$$I(q) = n \left\langle \left| \int_v [\rho(\mathbf{r}) - \rho_s \frac{v'}{v}] e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle_\Omega \quad (\text{II-7})$$

par rapport au solvant seul. Dans cette expression n et v sont la densité en nombre et le volume des objets, respectivement. v' est leur volume partiel dans la solution. $\rho(\mathbf{r})$ est la densité locale de longueur de diffusion de l'un des objets à la distance \mathbf{r} de son centre de gravité et ρ_s est la densité moyenne de longueur de diffusion du solvant. Ici les crochets, $\langle \dots \rangle_\Omega$, indiquent qu'il faut effectuer la moyenne sur toutes les orientations possible des macromolécules. Dans ce cas, l'intensité diffusée donne des informations sur la taille, la forme et la structure des diffuseurs. L'expression précédente peut être réécrite de la manière suivante :

$$I(q) = n (\langle \rho \rangle v - \rho_s v')^2 P(q) \quad (\text{II-8})$$

où $\langle \rho \rangle = v^{-1} \sum_i b_i$ est la densité moyenne de longueur de diffusion des objets et

$$P(q) = \left\langle \left| \frac{1}{\langle \rho \rangle v - \rho_s v'} \int_v r^2 \left[\rho(r) - \rho_s \frac{v'}{v} \right] e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle_\Omega \quad (\text{II-9})$$

leur facteur de forme. $P(0) \equiv 1$.

Il est d'usage très courant d'écrire l'expression (II-8) sous la forme suivante :

$$I(q) = \frac{Mc}{N_A} K^2 P(q) \quad (\text{II-10})$$

où N_A est le nombre d'Avogadro. $c = n M / N_A$ est la concentration en masse des objets diffusants (g cm^{-1}), M leur masse molaire et

$$\bar{K} = \langle \rho \rangle \bar{v} - \rho_s \bar{v}' \quad (\text{II-11})$$

leur contraste spécifique moyen. \bar{v} et \bar{v}' sont leurs volumes spécifique et spécifique partiel ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$), respectivement.

1.2.3. Interactions

Lorsque la solution colloïdale n'est pas infiniment diluée, il doit être tenu compte des interactions existant entre les particules. L'expression générale de l'intensité diffusée s'écrit alors :

$$I(q) = \frac{Mc}{N_A} K^2 P(q) S(q, c) \quad (\text{II-12})$$

où

$$S(q, c) = 1 + \frac{c N_A}{M} \int_V h(r) e^{i \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r} \quad (\text{II-13})$$

est le facteur de structure de la solution. C'est la transformée de Fourier de $h(r) = [g(r) - 1]$ où $g(r)$ est la fonction de corrélation des centres de gravité des objets diffusants. L'expression (II-13) n'est valable que pour des diffuseurs sphériques. Dans le cas contraire, elle devra être modifiée pour tenir compte d'éventuelles corrélations d'orientation¹⁰⁴.

Les interactions existant entre les particules en solution peuvent être évaluées par la détermination des coefficients du Viriel. Ce sont des quantités physiquement importantes que l'on peut déduire de la variation de l'intensité diffusée vers l'avant avec la

concentration, c , de l'échantillon. L'intensité diffusée vers l'avant peut être écrite de la manière suivante :

$$\frac{K^2 Mc}{N_A I(0,c)} = \frac{1}{S(0,c)} = \frac{M}{RT} \left. \frac{\partial \Pi}{\partial c} \right|_{T,P} = (1 + 2 A_2 Mc + 3 A_3 Mc^2 + \dots), \quad (\text{II-14})$$

où R est la constante des gaz parfaits, T la température, Π la pression osmotique et P la pression. A_2 , A_3 , ... sont le 2^{ème}, le 3^{ème}, ... coefficients du Viriel de la solution. A_2 décrit les interactions entre deux particules, A_3 celles entre trois particules, etc. Le coefficient A_2 est positif lorsque les interactions sont répulsives et négatif lorsqu'elles sont attractives.

De manière générale le spectre de diffusion peut être écrit sous la forme suivante :

$$\frac{K^2 Mc}{N_A I(q,c)} = \frac{1}{S(q,c)} = \frac{1}{P(q)} [1 + 2 A_2 Mc F_2(q) + 3 A_3 Mc^2 F_3(q) + \dots], \quad (\text{II-15})$$

où $F_2(q)$, $F_3(q)$, ... sont les transformées de Fourier des fonctions de corrélation directes de 2, 3, ... particules, normalisées à l'unité pour $q = 0$. Leurs expressions peuvent être calculées à partir de résultats donnés dans certains manuels de physique statistique^{105, 106}.

1.3. Rayon de giration

1.3.1. Définition

Le rayon de giration des diffuseurs est défini de la manière suivante :

$$R_g^2 = \frac{1}{\langle \rho \rangle_v - \rho_s} \int_v r^2 \left[\rho(\mathbf{r}) - \rho_s \frac{v'}{v} \right] d\mathbf{r} \quad (\text{II-16})$$

où \mathbf{r} est la distance mesurée par rapport au centre de gravité de la particule.

Le rayon de giration, de par sa définition, renferme des informations sur la taille et la forme de l'entité diffusante. Sa valeur dépend, cependant, du contraste. Comme le montre le

tableau ci-dessous, il est relié, de façon plus au moins complexe, aux paramètres géométriques caractérisant la particule. Ces résultats ne concernent que des particules homogènes de densité de longueur de diffusion constante, $\rho(r) = \langle \rho \rangle$.

Sphère de rayon R	$R_g^2 = 3R^2 / 5$
Sphère creuse de rayon interne R_1 et de rayon externe R_2	$R_g^2 = 3(R_2^5 - R_1^5) / 5(R_2^3 - R_1^3)$
Ellipsoïde d'axes a, b et c	$R_g^2 = (a^2 + b^2 + c^2) / 5$
Cylindre de base elliptique d'axes a et b et de hauteur h	$R_g^2 = (a^2 + b^2) / 4 + h^2 / 12$
Cylindre creux de rayon interne R_1 et de rayon externe R_2	$R_g^2 = (R_1^2 + R_2^2) / 2 + h^2 / 12$

Tableau II-1. Rayons de giration de quelques particules homogènes de formes simples.

1.3.2. Approximation de Guinier

L'approximation de Guinier est très souvent utilisée pour déterminer le rayon de giration apparent, $R_g(c)$, des diffuseurs¹⁰⁷. C'est une simplification assez arbitraire, mais très utile, de l'expression générale de l'intensité diffusée aux petites valeurs de q. Elle est, en général, acceptable tant que $qR_g(c) \leq 1$ et s'écrit :

$$I(q, c) \cong I(0, c) \exp \left[-\frac{q^2 R_g^2(c)}{3} \right]. \quad (\text{II-17})$$

Le tracé de $\ln [I(q, c)]$ en fonction de q^2 permet de déterminer simplement l'intensité diffusée vers l'avant et le rayon de giration apparent. A partir de l'expression (II-15) il est possible de montrer que le rayon de giration apparent dépend de la concentration et peut être développé comme suit :

$$R_g^2(c) = R_g^2(1 + 2 B_2 Mc + 3 B_3 Mc^2 + \dots)^{-1}, \quad (\text{II-18})$$

où les coefficients B_2 , B_3 , ... sont fonctions des coefficients du viriel et de la portée des interactions. Le rayon de giration réel, $R_g = R_g(0)$, sera obtenu par extrapolation à concentration nulle sans qu'il soit nécessaire de faire une quelconque hypothèse sur la forme ou la configuration interne des diffuseurs. Il est donc absolument nécessaire d'effectuer des

mesures de diffusion à différentes valeurs de la concentration lorsque les interactions entre les molécules de soluté ne sont pas négligeables.

1.4. Diffusion par des chaînes polymériques

Les objets fractals sont de forme irrégulière ou chaotique mais leurs propriétés géométriques sont invariantes par changement d'échelle.¹⁰⁸ La trajectoire d'une particule brownienne est un exemple de fractale. La compacité de la structure d'un objet fractal est caractérisée par sa dimension fractale, D . Elle quantifie la manière dont la masse, M , ou le nombre d'unités structurales, augmente avec la taille, R , de l'objet :

$$M \propto R^D. \quad (\text{II-19})$$

Les polymères linéaires sont des exemples d'objets fractals. Leur invariance par changement d'échelle permet de décrire leur conformation par des « lois d'échelle ».^{2, 109, 110} Dans l'espace habituel à trois dimensions, $D = 3$ pour une chaîne effondrée formant un globule compact, $D = 2$ pour une chaîne idéale, ou gaussienne, et $D \cong 1,7$ pour une chaîne présentant des interactions de volume exclu. La détermination de D permet donc de caractériser la conformation du polymère.

1.4.1. Chaînes flexibles

La chaîne flexible est un modèle assez simpliste de polymère sans aucune rigidité. L'expression du facteur de forme d'une chaîne flexible idéale a été établie par Debye.¹¹¹ Elle s'écrit :

$$P_D(x) = \frac{2}{x^2} [\exp(-x) - 1 + x] \quad (\text{II-20})$$

où $x = (qR_g)^2$. Aux grandes valeurs de x , cette expression à la forme asymptotique suivante :

$$\lim_{q \rightarrow \infty} P_D(q) = \frac{2}{(qR_g)^2} \quad (\text{II-21})$$

En présence d'interactions de volume exclu, la loi de Debye (II-20) demeure valable tant que $x \leq 9$.¹¹² Une approximation très utile de cette loi est¹¹³.

$$P_D(x) \cong [1 + 0,359 x^{1,103}]^{-1} \quad (\text{II-22})$$

où les valeurs numériques 0,359 et 1,103 confèrent à cette approximation une précision supérieure à $\pm 0,4\%$ pour $x \leq 13$.

D'une manière générale, pour des valeurs de vecteur d'onde de transfert supérieures à $3R_g^{-1}$, le facteur de forme d'une chaîne aléatoire flexible se comporte de la manière suivante:^{2, 109}

$$P(q) \approx \frac{P_\infty}{qR_g^{1/\nu}} \quad (\text{II-23})$$

où P_∞ est l'amplitude et $D = 1/\nu$ la dimension fractale. ν est l'exposant de Flory.¹¹⁴

Comme le montre l'expression (II-21), $P_\infty = 2$ et $\nu = 0,5$ lorsque la chaîne est idéale. Par contre, $P_\infty = 1.22$ et $\nu = 0.588$ pour une chaîne présentant des interactions de volume exclu.¹¹⁵ La mesure des deux quantités P_∞ et ν permet de déterminer la conformation moyenne de la chaîne et la nature des interactions entre cette dernière et le solvant.

1.4.2. Chaîne à longueur de persistance

Une chaîne à longueur de persistance correspond à un modèle plus réaliste de polymère. C'est une chaîne aléatoire dont la structure évolue continûment vers celle d'un bâtonnet lorsque la distance entre deux points de la chaîne devient inférieure à la longueur statistique. Cette dernière représente la portée des corrélations d'orientation le long de la chaîne. Une chaîne à longueur de persistance possède donc une certaine rigidité. Deux paramètres définissent un tel système : sa longueur curviligne, L , et sa longueur statistique, b . La loi de Debye (II-20) demeure valable tant que $qR_g < 3$. Le rayon de giration de la chaîne a été calculé par Benoît et Doty.¹¹⁶ Il s'exprime de la façon suivante :

$$R_g^2 = R_g'^2 \left[1 - \frac{3}{2n} + \frac{3}{2n^2} - \frac{3}{4n^3} (1 - e^{-2n}) \right], \quad (\text{II-24})$$

où $R_g'^2 = Lb/6$ et $n = L/b$ est le nombre d'unités statistique de la chaîne.

Le comportement décrit par l'expression (II-23) reste aussi valable dans le domaine intermédiaire de vecteur d'onde de transfert, tel que $3R_g^{-1} \leq q \leq 2b^{-1}$. Par contre, lorsque $q \geq 2b^{-1}$ le facteur de forme peut être décrit par l'approximation suivante :¹¹⁷

$$P(q) = \frac{1}{qL} \left(\pi + \frac{4}{3qb} \right) \quad (\text{II-25})$$

qui n'est valable que pour une chaîne de longueur infinie ($L \gg b$). Cette approximation n'est pas suffisante pour décrire correctement les spectres de diffusion des protéines totalement dépliées car ces dernières ne sont pas suffisamment longues. Pour de telles chaînes, de bien meilleures expressions analytiques ont été obtenues par Pedersen et Schurtenberger à partir des résultats de simulations effectuées par la méthode de Monte Carlo.¹¹⁸ Ces auteurs ont donné trois méthodes différentes pour établir une approximation précise du facteur de forme d'une chaîne aléatoire. Dans ce qui suit, nous ne donnerons que les résultats de la troisième méthode qui permet d'obtenir, de la même manière, le facteur de forme d'une chaîne aléatoire avec ou sans volume exclu. Seul le cas des chaînes relativement longues ($L > 4b$) sera considéré.

1.4.2.1. Chaîne vermiforme idéale

Le facteur de forme est décrit comme celui d'une chaîne idéale pour $qb < 3,1$ et par celui d'un bâtonnet aux valeurs supérieures. La région de recouvrement est représentée par une fonction empirique qui ne dépend que de la longueur relative L/b . Cette approximation est basée sur les expressions de Burchard et Kajiwara.¹¹⁹ dans lesquelles la fonction de diffusion calculée par Sharp et Bloomfield¹²⁰ est utilisée aux faibles valeurs de q . Pour $qb < 3,1$, le facteur de forme d'une chaîne idéale est représenté par l'expression suivante :

$$P_{SB}(q, L, b) = P_D(x) + \frac{b}{15L} \left[4 + \frac{7}{x} - \left(11 + \frac{7}{x} \right) e^{-x} \right] \quad (\text{II-26})$$

où $x = (qR'_g)^2$ avec $R_g'^2 = Lb/6$. Cette expression diffère légèrement de celle de Sharp et Bloomfield dans laquelle l'argument de la fonction de Debye est $x = (qR_g)^2$ où R_g est la valeur réelle du rayon de giration donnée par l'expression (II-24).

Pour $qb > 3,1$ Pedersen et Schurtenberger¹¹⁸ exprime le facteur de forme par une somme de lois en puissances de q :

$$P_{PS}(q, L, b) = \frac{a_1}{(qb)^{p_1}} + \frac{a_2}{(qb)^{p_2}} + \frac{\pi}{qL} \quad (II-27)$$

dont le comportement s'approche de la fonction de diffusion d'un bâtonnet lorsque $qb \rightarrow \infty$. Dans cette expression $p_1 = 4,95$ et $p_2 = 5,29$. Ces valeurs ont été déterminées par comparaison aux résultats de simulations numériques. Le raccordement des expressions (II-26) et (II-27) est obtenu en ajustant les paramètres a_1 et a_2 , de façon telle que les deux fonctions et leurs dérivées premières par rapport à q soient continues pour $qb = 3,1$. Les paramètres a_1 et a_2 ont donc pour valeurs :

$$a_1 = \left[(P_{SB}(u_0) + \frac{1}{p_2} P'_{SB}(u_0) - \frac{\pi b}{u_0 L} (1 - \frac{1}{p_2})) p_2 \frac{u_0^{p_1}}{p_2 - p_1} \right] \quad (II-28)$$

et

$$a_2 = \left[(P_{SB}(u_0) + \frac{1}{p_1} P'_{SB}(u_0) - \frac{\pi b}{u_0 L} (1 - \frac{1}{p_1})) p_1 \frac{u_0^{p_2}}{p_1 - p_2} \right] \quad (II-29)$$

où $u_0 = q_0 b = 3,1$ et

$$P'_{SB}(u) = 2u \frac{dP_{SB}(u)}{du}. \quad (II-30)$$

1.4.2.2. Chaîne vermiforme avec volume exclu

Aux faibles valeurs de q , il y a une grande différence entre les fonctions de diffusion d'une chaîne aléatoire avec et sans effet de volume exclu. Par conséquent, l'expression de Sharp et Bloomfield (II-26) doit être modifiée pour tenir compte de cet effet.

Tout d'abord il nécessaire de remplacer la fonction de Debye par une nouvelle expression capable de décrire le facteur de forme d'une chaîne à volume exclu. Ce nouveau facteur de forme, $P_{EX}(q, L, b)$, a été déterminé en adaptant les expressions d'Utiyama et al¹²¹. Pedersen et Schurtenberger¹¹⁸ ont obtenu l'approximation suivante :

$$P_{EX}(q, L, b) = W(x)P_D(q, L, b) + [1 - W(x)][c_1 x^{-1/\nu} + c_2 x^{-2/\nu} + c_3 x^{-3/\nu}] \quad (II-31)$$

où $x = (qR_g)^2$, R_g étant maintenant le rayon de giration d'une chaîne à volume exclu :

$$R_g^2 = [\alpha_s(L/b)]^2 R_g'^2. \quad (II-32)$$

$\alpha_s(L/b)$ est le facteur de dilatation de la chaîne sous l'effet des interactions de volume exclu. Il est donné par l'expression suivante :

$$\alpha_s(y) = \left[1 + \left(\frac{y}{3,12} \right)^2 + \left(\frac{y}{8,67} \right)^3 \right]^{\frac{2\nu-1}{6}} \quad (II-33)$$

où $\nu = 0,588$ est l'exposant de Flory.

Dans l'expression (II-31) $W(x)$ est la fonction empirique suivante :

$$W(x) = \frac{1}{2} \left(1 - \tanh \frac{x - c_4}{c_5} \right) \quad (II-34)$$

Finalement les valeurs des constantes apparaissant dans les expressions (II-33) et (II-36) sont : $c_1 = 1,2200$, $c_2 = 0,4288$, $c_3 = -1,651$, $c_4 = 1,523$ et $c_5 = 0,1477$.

Le second terme du membre de droite de l'expression (II-26), qui tient compte de la rigidité locale de la chaîne, doit aussi être légèrement modifié pour pouvoir décrire les résultats des simulations. Lorsque les interactions de volume exclu sont présentes, Pedersen et Schurtenberger ont montré que le facteur de forme de la chaîne pouvait être écrit sous la forme suivante.¹¹⁸

$$P_{SB}(q, L, b) = P_{EX}(q, L, b) + C(L/b) \frac{b}{15L} \left[4 + \frac{7}{x} - \left(11 + \frac{7}{x} \right) e^{-x} \right] \quad (II-35)$$

où la fonction correctrice, $C(L/b)$, est

$$C(L/b) = a_4 (L/b)^{-p_3} \quad (II-36)$$

pour $L > 10 b$. Les valeurs numériques des constantes sont $a_4 = 3,06$ et $p_3 = 0,44$. Pour des chaînes plus courtes aucune correction n'est nécessaire et $C(L/b) = 1$.

Les résultats précédents ne décrivent le facteur de forme que pour $qb < 3,1$. Aux valeurs supérieures de q les expressions (II-28) à (II-30), établies pour une chaîne idéale, demeurent valables à condition d'utiliser l'expression (II-35) au lieu de (II-26).

1.4.2.3. Chaîne réelle

Il est nécessaire de tenir compte du fait qu'une chaîne réelle n'est pas infiniment mince et donc qu'elle a un rayon transverse moyen, R_T , non nul. Le facteur de forme d'une chaîne réelle pourra être décrit par l'expression:^{112, 118}

$$P(q, L, b, R_T) = [P_{SB}(q, L, b, R_T) + P_{PS}(q, L, b, R_T)] P_T(q, R_T), \quad (\text{II-37})$$

où les expressions de $P_{SB}(q, L, b, R_T)$ et $P_{PS}(q, L, b, R_T)$ ont été données dans le paragraphe précédent pour des chaînes avec et sans volume exclu. Leur somme est le facteur de forme de l'axe de la chaîne et

$$P_T(q, R_T) = \left(\frac{2 J_1(qR_T)}{qR_T} \right)^2 \quad (\text{II-38})$$

celui d'un disque de rayon R_T représentant la section de la chaîne réelle. $J_1(x)$ est la fonction de Bessel du 1^{er} ordre. La valeur de R_T dépend fortement du contraste local et donc de la structure du solvant au voisinage immédiat de la chaîne.

Pedersen et Schurtenberger ont vérifié le bien fondé de leurs diverses approximations en utilisant les résultats expérimentaux de Rawiso et al obtenus avec des solutions de polystyrène dans du bisulfure de carbone.¹¹² Ce dernier est un bon solvant du polystyrène et les chaînes polymériques y présentent des interactions de volume exclu. Les mesures avaient été réalisées avec du polystyrène naturel, totalement deutéré et deutéré partiellement, soit sur les groupes phényle ou le squelette.

1.4.2.4. Effets concentration

Les expressions du paragraphe 1.2.3 font intervenir les corrélations entre les centres de gravité des molécules de soluté. Dans le cas de chaînes aléatoires il est plus judicieux de considérer celles existant transversalement entre leurs axes, ou en d'autres termes, entre les monomères de deux chaînes différentes. En utilisant la méthode de calcul de Benoit et Benmouna^{.122}, il est facile de montrer que l'intensité diffusée s'écrit :

$$I(q) = \frac{Mc}{N_A} K^2 P(q) \left[1 + \frac{cN_A}{M} P(q) h_T(q, c) \right] \quad (\text{II-39})$$

où

$$h_T(q, c) = \int_V [g_T(r, c) - 1] e^{iq \cdot r} d^3r \quad (\text{II-40})$$

$g_T(r, c)$ étant, maintenant, la fonction de corrélation transverse des axes d'une paire de chaînes séparés par la distance r . La limite thermodynamique de $h_T(q, c)$ est :

$$\frac{cN_A}{M} h_T(0, c) = \frac{RT}{M} \left. \frac{\partial \Pi}{\partial c} \right|_{T,P}^{-1} - 1 = - \frac{2A_2 Mc + 3A_3 Mc^2 + \dots}{1 + 2A_2 Mc + 3A_3 Mc^2 + \dots}. \quad (\text{II-41})$$

Au premier ordre en c , nous retrouvons le résultat de Zimm^{.123} en supposant, comme lui, que les chaînes ont une section nulle et donc que les interactions sont ponctuelles, c'est à dire que $h_T(r, c) = [g_T(r, c) - 1] = 2A_2 M^2 N_A^{-1} c \delta(r)$ où $\delta(r)$ est la fonction de Dirac.

Comme l'expression (II-14) du paragraphe 1.2.3, l'expression (II-41) peut être généralisée sous la forme suivante :

$$\frac{cN_A}{M} h_T(q, c) = - \frac{2A_2 Mc F_{T2}(q) + 3A_3 Mc^2 F_{T3}(q) + \dots}{1 + 2A_2 Mc F_{T2}(q) + 3A_3 Mc^2 F_{T3}(q) + \dots}. \quad (\text{II-42})$$

où $F_{T2}(q)$, $F_{T3}(q)$, ... sont les transformées de Fourier des fonctions de corrélation directes des sections de 2, 3, ... chaînes, normalisées à l'unité pour $q = 0$. Ce résultat tout à fait général diffère sensiblement de celui donné par Benoit et Benmouna^{.123}.

Pour le modèle utilisé précédemment, dans lequel une chaîne polymérique est représentée par un cylindre semi-flexible de rayon moyen R , la transformée de Fourier de la fonction de corrélation transverse de 2 chaînes peut être décrite par l'approximation suivante :

$$F_{T2}(q) \cong \left(\frac{2J_1(qR_C)}{qR_C} \right)^2. \quad (\text{II-43})$$

où R_C est la longueur de corrélation dont la valeur dépend des interactions réelles entre les deux chaînes et inclus donc l'effet du solvant. Pour des sections de chaînes se comportant comme des disques durs de rayon R , le volume exclu est seulement dû à l'effet stérique et

$$R_C^2 = (2R)^2 = \frac{A_2 M^2}{\pi L N_A}. \quad (\text{II-44})$$

Pour décrire les spectres de diffusion de la caséine β totalement dépliée par du chlorure de guanidinium, nous utiliserons donc l'approximation suivante :

$$I(q, c) \cong \frac{Mc}{N_A} K^2 P(q) [1 - 2A_2 Mc P(q) F_{T2}(q)] \quad (\text{II-45})$$

où le facteur de forme d'une chaîne, $P(q)$, est donné par l'expression (II-37) et $F_{T2}(q)$ par l'expression (II-43). En développant ces trois dernières expressions au premier ordre en q^2 , il est possible de montrer que le carré du rayon de giration apparent des diffuseurs est

$$R_g^2(c) \cong R_g^2(0) [1 - 2B_2 Mc] \quad (\text{II-46})$$

avec

$$B_2 = A_2 \left(1 + \frac{R_C^2}{4R_g^2(0)} \right) \quad (\text{II-47})$$

et

$$R_g^2(0) = R_g^2 + \frac{3}{4} R_I^2 \cong R_g^2, \quad (\text{II-48})$$

où R_g^2 est le rayon de giration de l'axe de la chaîne et R_T^2 son rayon transverse. Comme nous le verrons plus loin $R_T^2 / R_g^2 \leq 1\%$.

Comme $R_g^2(0) \gg R_C^2$, $F_{T2}(q) \cong 1$ aux petites valeurs de q . Si, de plus, $2A_2Mc \ll 1$, l'expression (II-45) peut être réécrite

$$\frac{M K^2 c}{N_A I(q, c)} \cong \frac{1}{P(q)} + 2A_2 M c. \quad (\text{II-49})$$

La substitution de l'approximation (II-22) pour $P(q)$ dans l'expression (II-49) montre que le spectre de diffusion d'une solution diluée de polymère pourra être représenté par l'expression suivante :

$$[I(q, c)]^{-1} \cong [I(0, c)]^{-1} \left\{ 1 + 0,359 [q R_g(c)]^{2,206} \right\} \quad (\text{II-50})$$

lorsque $q R_g(0) < 3$. En d'autres termes, dans ce domaine de valeurs de q le spectre de diffusion conserve la forme de Debye pour des valeurs relativement faible de la concentration.

Le tracé de $[I(q, c)]^{-1}$ en fonction de $q^{2,206}$ permet de déterminer simplement l'intensité diffusée vers l'avant, $I(0, c)$, et le rayon de giration apparent dont la valeur est

$$[R_g(c)]^{-2,206} \cong [R_g(0)]^{-2,206} (1 + 2A_2 M c) \quad (\text{II-51})$$

Le rayon de giration réel, $R_g(0)$, sera obtenu par extrapolation à concentration nulle en utilisant la formule précédente.

Le second coefficient du viriel, A_2 , d'une solution de polymères est donné par l'expression suivante :¹²⁴

$$A_2 = \Psi 4\pi^{3/2} N_A R_g^3 M^{-2} \quad (\text{II-52})$$

où Ψ est la fonction d'interpénétration. Pour une chaîne de longueur infinie ($L/b \rightarrow \infty$) la fonction Ψ peut prendre deux valeurs extrêmes : $\Psi = 0$, pour une chaîne idéale et $\Psi \cong 0.23$, lorsque les interactions de volume exclu sont présentes.

En fait la valeur de Ψ dépend de la longueur, L , de la chaîne et de la portée des interactions de volume exclu, B .¹²⁴⁻¹²⁶ Dans la figure II-2 les courbes entrants pleins montrent comment Ψ varie avec, L lorsque B reste constant, et celles en traits pointillés comment Ψ varie avec B , lorsque L est fixe. Ce dernier cas est le plus intéressant car il correspond aux expériences habituellement réalisées, dans lesquelles on change la qualité du solvant d'une solution de macromolécules données. Les résultats de la figure II-2 ne sont pas généraux. Ils ont, en effet, été calculés pour le polystyrène atactique en utilisant un modèle hélicoïdal qui tient compte, à la fois, de la rigidité, de la courbure et de la torsion de la de chaîne.²² Ils devraient, cependant, constituer une bonne approximation pour la caséine β complètement dépliée par du GdmCl.

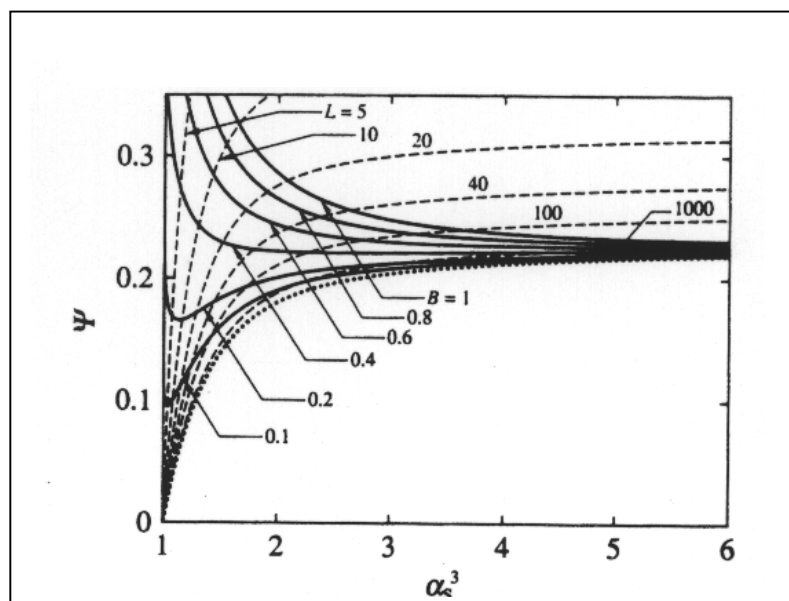


Figure II.2. Variation de la fonction d'interpénétration, ψ , en fonction du cube du facteur de dilatation, α_e . B représente la portée des interactions de volume exclu. Ici L est la longueur de la chaîne mesurée en unité de longueur statistique (L/b). D'après la référence ¹²⁶.

1.5. Diffusion par les micelles de caséine β

Leclerc et al.^{31, 32} ont montré, qu'aux valeurs de q inférieures à $0,06 \text{ \AA}^{-1}$, une micelle de caséine β peut être considéré comme un objet sphérique constitué d'un cœur, de rayon R_1 , entouré par une couronne, de rayon externe R_2 , dont les densités de longueur de diffusion sont différents mais constantes. La micelle a donc un profil de densité semblable à celui de la figure II-3. Il correspond à la fonction de distribution suivante :

$$\begin{aligned}\phi(r) &= \phi_1 = 3\phi_0 / 4\pi R_1^3 && \text{si } 0 \leq r < R_1, \\ \phi(r) &= \phi_2 = 3\phi_0 / 4\pi(R_2^3 - R_1^3) && \text{si } R_1 \leq r < R_2, \\ \phi(r) &= 0 && \text{si } r > R_2.\end{aligned}\tag{II-53}$$

Dans ces expressions ϕ_0 est la proportion d'acides aminés dans le cœur de la micelle, par rapport au nombre total.

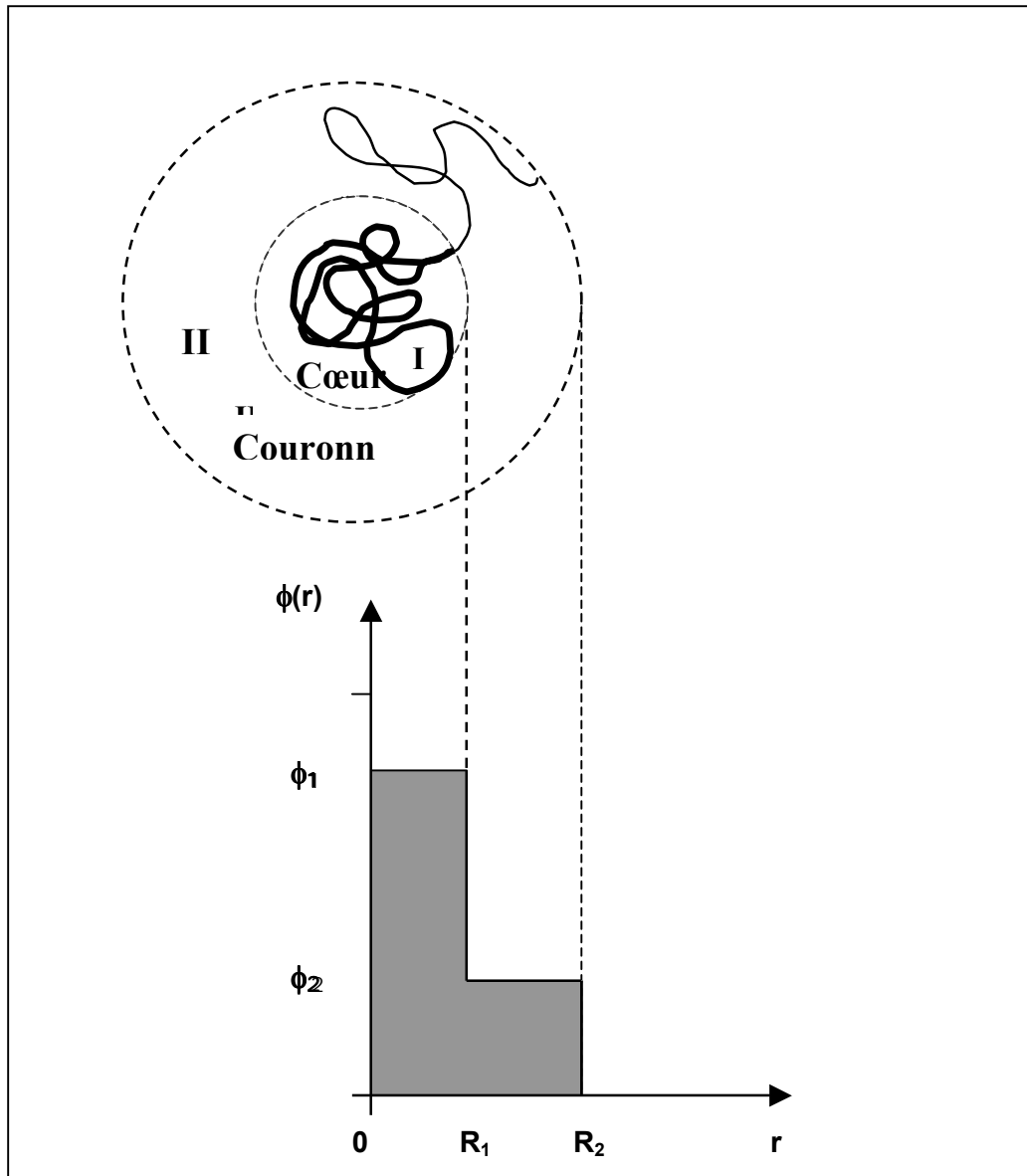


Figure-II.3: Représentation du profil de densité utilisé pour décrire les spectres de diffusion des micelles de caséine β .

Le facteur de forme de la micelle peut être calculé à partir de sa définition (II-11). Dans le cas présent, l'amplitude du facteur de forme s'écrit :

$$A(q) = \frac{4\pi}{q} \int_0^{\infty} r \phi(r) \sin(qr) dr . \quad (\text{II-54})$$

En substituant à $\phi(r)$ son expression (II-53) on obtient :

$$A(q) = \frac{4\pi}{q} \left[\phi_1 \int_0^{R_1} r \sin(qr) dr + \phi_2 \int_{R_1}^{R_2} r \sin(qr) dr \right]. \quad (\text{II-55})$$

Le facteur de forme de la micelle est donc :

$$P(q) = \left[\frac{3\phi_0}{q^3 R_1^3} F(qR_1) + \frac{3(1-\phi_0)}{q^3 (R_2^3 - R_1^3)} [F(qR_2) - F(qR_1)] \right]^2 \quad (\text{II-56})$$

où

$$F(x) = \int x \sin x dx = \sin x - x \cos x. \quad (\text{II-57})$$

Le rayon de giration de la micelle peut être calculé à partir de sa définition (II-17). Il est donné par expression suivante :

$$R_g^2 = \frac{\int_0^\infty r^4 \phi(r) \sin(qr) dr}{\int_0^\infty r^2 \phi(r) \sin(qr) dr}. \quad (\text{II-58})$$

En utilisant l'expression (II-53) pour la fonction de distribution $\phi(r)$, on obtient :

$$R_g^2 = \frac{3}{5} \left[\frac{(\phi_1 - \phi_2) R_1^5 + \phi_2 R_2^5}{(\phi_1 - \phi_2) R_1^3 + \phi_2 R_2^3} \right]. \quad (\text{II-59})$$

1.6. Mesures de la diffusion des neutrons

1.6.1. Appareillage

Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles ont été réalisées avec le spectromètre PACE du Laboratoire Léon Brillouin à Saclay. La figure.II-4 représente le schéma de cet appareil qui est destiné à l'étude de la diffusion isotrope aux petits angles. Il a une symétrie cylindrique dont l'axe est celui du faisceau direct. Il est équipé d'un détecteur constitué de 30 cellules annulaires concentriques et d'une cellule centrale à 4 quadrants. Cette

dernière permet de centrer le détecteur sur le faisceau direct et de mesurer la transmission des échantillons après atténuation du faisceau direct. PACE permet d'enregistrer l'intensité diffusée pour des valeurs du nombre d'onde de transfert comprises entre 2.10^{-3} et $7.10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. L'acquisition des données est faite par un microprocesseur, piloté par un PC. Le traitement complet des données peut être effectué par le même ordinateur grâce au programme PASIDUR¹²⁷ de D. Lairez.

1.6.2. Conditions expérimentales

Pour les q faibles, $0.0061 \leq q \leq 0.0642 \text{ \AA}^{-1}$, on a utilisé comme longueur d'onde, $\lambda = 11.13 \text{ \AA}$, les diamètres des diaphragmes définissant la divergence du faisceau incident étaient $\phi_1 = 7 \text{ mm}$ et $\phi_2 = 10 \text{ mm}$, la distance entre l'échantillon et le détecteur était de $d_{\text{nai}} = 2800 \text{ mm}$, $d_{\text{f-e}} = 49 \text{ mm}$ et le diviseur 241. Par contre pour les q élevées, $0.0467 \leq q \leq 0.471 \text{ \AA}^{-1}$, on a utilisé comme : $\lambda = 5.043 \text{ \AA}$, $\phi_1 = 7 \text{ mm}$, $\phi_2 = 16 \text{ mm}$, $d_{\text{nai}} = 0.800 \text{ m}$, $d_{\text{f-e}} = 49 \text{ mm}$ et diviseur 241.

Echantillons dans des cuves Hellma. d'épaisseurs 5mm pour les solutions de protéine et tampon, 1mm pour H_2O , et le vide et un échantillon de B_4C . La température à l'intérieur de la cellule est régulée par un bain thermostaté

Dans chaque configuration de l'appareil, nous avons mesuré le spectre de diffusion et la transmission de la solution de protéine et du tampon correspondant, ceux de l'eau et de la cuve vide et le spectre de diffusion d'un absorbant, constitué de carbure de bore et de cadmium.

En général, le spectre de diffusion de chaque échantillon est enregistré pendant 6 heures, afin d'avoir une précision statistique convenable. Par contre 30 mn suffisent pour l'absorbant qui ne sert qu'à déterminer le bruit de fond électronique des détecteurs. Les spectres de diffusion de l'eau et de la cuve vide servent principalement à effectuer la correction de sensibilité des détecteurs annulaires. En effet, l'eau légère est fort diffuseur incohérent dont le spectre de diffusion ne dépend pas de q dans le domaine angulaire habituellement couvert par la DNPA.

Dans le cas des échantillons de protéine dénaturée nous avons mesuré la diffusion pendant 12 heures, ou plus, à raison d'une demi-heure par spectre, afin de suivre la mise à l'équilibre du système. Une fois l'équilibre atteint un dernier spectre a été enregistré pendant deux heures seulement.

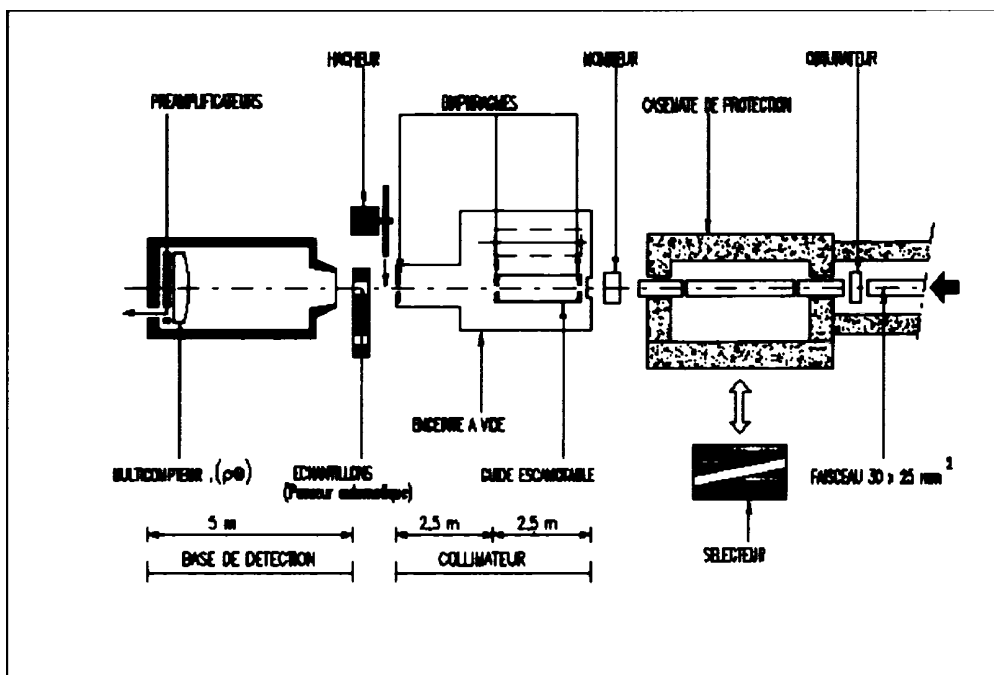


Figure. II-4 : Schéma du spectromètre de diffusion PACE. Le faisceau incident est focalisé par deux diaphragmes espacé de 2,8m, et de diamètres f_1 et f_2 . A la sortie du collimateur, le faisceau est diffusé par l'échantillon, puis traverse un tube vide, avant d'arriver au détecteur. Ce détecteur est relié à un ordinateur qui comptabilise le nombre de neutrons détectés pour chaque angle de diffusion correspondant à chaque anneau.

1.6.3. Traitement des spectres bruts

1.6.3.1. Transmissions

La transmission, T , d'un échantillon contenu dans une cuve est le rapport de l'intensité transmise par celui-ci à celle de la cuve vide:

$$T_{\text{éch}} = I_{\text{éch}}(0)/I_{\text{cv}}(0) \quad (\text{II-60})$$

Le détecteur saturant lorsqu'il est soumis au faisceau direct, une fraction du flux incident est absorbé au moyen d'atténuateurs constitués de plaques de Plexiglas.

L'intensité diffusée par un échantillon quelconque est fonction de sa transmission, de son épaisseur et de sa section efficace de diffusion. Cette dernière dépend de la longueur d'onde des neutrons incidents car la diffusion n'est pas toujours parfaitement élastique. Ceci est particulièrement valable pour l'eau, dont la masse moléculaire n'est pas totalement négligeable devant celle des neutrons. Il en est de même de la transmission, même pour une diffusion parfaitement élastique. En effet, la transmission d'un échantillon est :

$$T(\lambda) = \exp\{-[\sigma_{\text{Dif}}(\lambda) + \sigma_{\text{Abs}}(\lambda)]l\} \quad (\text{II-61})$$

où l est le trajet optique du faisceau de neutrons dans l'échantillon. $\sigma_{\text{Dif}}(\lambda)$ et $\sigma_{\text{Abs}}(\lambda)$ sont, respectivement, les sections efficaces totale de diffusion et d'absorption de ce dernier. Elles dépendent toutes les deux de la longueur d'onde des neutrons.

1.6.3.2. Intensité diffusée

L'intensité diffusée par l'unité de volume d'un échantillon quelconque, composé de sa cuve et de son contenu, peut s'écrire :

$$I'_{\text{Cont+CV}}(\lambda, q) = I_i(\lambda) S \Delta\Omega C(\lambda) T_{\text{Cont+CV}}(\lambda) \times \quad (\text{II-62})$$
$$\times [e_{\text{CV}} \times I_{\text{CV}}(\lambda, q) + e_{\text{Cont}} I_{\text{Cont}}(\lambda, q) + B(q)] + B_{\text{Amb}}$$

où S est la section du faisceau incident d'intensité $I_i(\lambda)$. $\Delta\Omega$ est l'angle solide de collection du détecteur et $C(\lambda)$ son rendement pour des neutrons de longueur d'onde λ . e_{CV} est l'épaisseur des parois de la cuve et e_{Cont} son trajet optique interne, c'est à dire l'épaisseur de son contenu. $I_{\text{CV}}(\lambda, q)$ et $I_{\text{Cont}}(\lambda, q)$ sont les sections efficaces de diffusion, par unité de volume et d'angle solide, de la cuve vide et de son contenu. $B(q)$ est un bruit de fond provenant des ailes du faisceau direct dues à une collimation imparfaite et à la diffusion par l'air au voisinage de l'échantillon. B_{amb} est le bruit de fond ambiant. De la même manière, l'intensité diffusée par la cuve vide est :

$$I'_{CV}(\lambda, q) = I_i(\lambda) S \Delta \Omega C(\lambda) T_{CV}(\lambda) [e_{CV} I_{CV}(\lambda, q) + B(q)] + B_{Amb} \quad (II-63)$$

Il en résulte que la quantité

$$\begin{aligned} I'_{Cont}(\lambda, q) &= \frac{I'_{Cont+CV}(\lambda, q) - B_{Amb}}{T_{Cont+CV}(\lambda)} - \frac{I'_{CV}(\lambda, q) - B_{Amb}}{T_{CV}(\lambda)} \\ &= I_i(\lambda) S \Delta \Omega C(\lambda) e_{Cont} I_{Cont}(\lambda, q) \end{aligned} \quad (II-64)$$

est indépendante des bruits de fond et représente la seule diffusion du contenu de la cuve.

Les spectres de l'eau et de la cuve vide permettent de corriger les spectres des échantillons et de leurs tampons des variations de la réponse des divers détecteurs. En effet, aux petites valeurs de q , l'intensité diffusée par l'eau légère

$$\begin{aligned} I'_{H_2O}(\lambda, q) &= \frac{I'_{H_2O+CV}(\lambda, q) - B_{Amb}}{T_{H_2O+CV}(\lambda)} - \frac{I'_{CV}(\lambda, q) - B_{Amb}}{T_{CV}(\lambda)} \\ &= I_i(\lambda) S \Delta \Omega C(\lambda) e_{H_2O} I_{H_2O}(\lambda, q) \end{aligned} \quad (II-65)$$

est principalement d'origine incohérente et donc indépendante de q . En général l'épaisseur de cet échantillon d'eau légère est fixé à 1 mm afin d'avoir une transmission de l'ordre de 0,5.

1.6.3.3. Traitement des spectres bruts

Les données expérimentales sont traitées selon la procédure habituelle, suggérée par les considérations précédentes et décrite par Cotton¹⁰¹ et Calmettes¹²⁸, en utilisant le programme PASIDUR écrit par D. Lairez¹²⁷ du Laboratoire Léon Brillouin. Pour chaque valeurs de q ce programme calcule la quantité suivante :

$$I_{Prot}(\lambda, q) = \frac{I'_{Sol}(\lambda, q) - I'_{Tamp}(\lambda, q)}{I'_{H_2O}(\lambda, q)} \frac{1}{V} \frac{d\sigma_{H_2O}(\lambda)}{d\Omega} \Bigg|_{Mes} \quad (II-66)$$

où $I'_{\text{Sol}}(\lambda, q)$ et $I'_{\text{Tamp}}(\lambda, q)$ sont donnés par l'expression (II-64) pour la solution de protéine et son tampon, respectivement, et $I'_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, q)$ par l'expression (II-65). $V^{-1} d\sigma_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda) / d\Omega \Big|_{\text{Mes}}$ est la section efficace de diffusion de l'unité de volume de l'échantillon d'eau légère mesuré avec des neutrons de longueur d'onde λ .

1.6.3.4. Calibration absolue

Pour obtenir la valeur absolue de la section efficace de diffusion incohérente de l'échantillon d'eau légère, le détecteur est déplacé de façon à pouvoir mesurer le faisceau direct avec les mêmes détecteurs que ceux employés lors des mesures des intensités diffusées. Pour éviter la saturation de ceux-ci, le faisceau direct est préalablement atténué. Le facteur d'atténuation est obtenu en faisant le rapport de l'intensité diffusée par un matériau fortement diffusant, comme le graphite ou le Téflon, en absence et en présence de l'atténuateur. de cette manière nous avons pu estimer la section efficace de diffusion de l'échantillon d'eau légère de 1 mm d'épaisseur à $0,81 \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda = 5 \text{ \AA}$. L'intensité diffusée vers l'avant, $I_1(0, c)^{32}$, par une solution de monomères de caséine β est telle que :

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{I_1(0, c)}{c} = (0,023 \pm 0,01) \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1} \text{ sr}^{-1}. \quad (\text{II-67})$$

Ce résultat a été obtenu en présence de GdmCl. En utilisant la valeur de $\bar{v}' = 0.742 \text{ g}^{-1} \text{ cm}$, donnée par Swaisgood⁶² les expressions (II.12) et (II.13) donnent pour cette quantité une valeur d'environ $0,025 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1} \text{ sr}^{-1}$. L'accord est tout à fait satisfaisant.

1.6.3.5. Bruit de fond incohérent.

Pour obtenir le spectre de diffusion cohérente d'un échantillon il est enfin souvent nécessaire de corriger le résultat donné par l'expression (II-66) de la diffusion incohérente du soluté. Lorsqu'une protéine est mise en solution dans un tampon deutérié, un certain nombre, N des atomes d'hydrogène qu'elle contient ne s'échangent pas contre les atomes de deutérium du milieu et donnent une contribution incohérente. Alors

$$I_{\text{Prot}}(\lambda, q) = I_{\text{Prot}}^{\text{Coh}}(\lambda, q) + \Delta I_{\text{Prot}}^{\text{Inc}}(\lambda, q) \quad (\text{II-68})$$

où le premier terme du second membre désigne la contribution cohérente à la diffusion et le second la contribution incohérente.

Cette dernière peut être évaluée de la manière suivante :

$$\Delta I_{\text{Prot}}^{\text{Inc}}(\lambda, q) = \frac{N_{\text{Prot}}}{N_{\text{H}_2\text{O}}} I_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, q) \quad (\text{II-69})$$

où N_{Prot} et $N_{\text{H}_2\text{O}}$ sont, respectivement, les molarités des atomes d'hydrogène dans la solution de protéine et dans l'eau légère.

La caséine β contient 1696 atomes d'hydrogène inéchangeables, car liés à des atomes de carbone, et 331 atomes échangeables. Comme la caséine β n'est pas globulaire il est légitime de supposer que la totalité de ces derniers s'échangent dans l'eau lourde. Il en résulte sur la contribution incohérente représente environ 2% de l'intensité cohérente diffusée vers l'avant.

L'expression (II.69) ne donne qu'une estimation de la contribution incohérente due aux atomes d'hydrogène de la protéine car elle suppose que la diffusion multiple, et donc la transmission, sont les mêmes dans la solution de protéine et dans l'échantillon d'eau légère de 1 mm d'épaisseur. D'autre part, même si de grandes précautions sont prises lors de la préparation des échantillons en milieu deutéré, ils restent sujets à de légères contaminations accidentelles. En conséquence, $\Delta I_{\text{Prot}}^{\text{Inc}}(\lambda, q)$ sera souvent regardé comme un paramètre ajustable, en particulier lors de l'interprétation des spectres de diffusion obtenus à des valeurs de q supérieures à environ $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ où l'intensité diffusée est très faible.

2. Réflectivité de neutrons

2.1. PRINCIPE DE LA REFLECTIVITE

Une surface est placée sous un faisceau polychromatique de neutrons de vecteur d'onde, $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta)$, θ est l'angle rasant d'incidence. Cette surface est définie par l'interface entre l'air et un milieu d'indice de réfraction n . Si on néglige l'absorption des neutrons, n s'exprime par¹³ :

$$n(z) = 1 - \frac{\lambda^2 Nb(z)}{2\pi} \quad (\text{II-70})$$

où λ est la longueur d'onde, $Nb(z)$ est la densité de longueur de diffusion cohérente. $Nb(z)$ peut être exprimée en terme de fraction volumique, $\phi(z)$ de la molécule à une distance z (profondeur) de l'interface:

$$Nb(z) = \phi(z)Nb_m + (1 - \phi(z))Nb_s, \quad (\text{II-71})$$

où Nb_m est la densité de longueur de diffusion cohérente de la molécule et Nb_s est celle du solvant.

Le faisceau de neutrons est réfléchi suivant la loi de Descartes :

$$\cos(\theta_1) = n \cos(\theta_2) \quad (\text{II-72})$$

où θ_1 est l'angle d'incidence rasant et θ_2 est l'angle de réfraction rasante (fig. II-5). La réflexion est totale lorsque θ_1 est inférieur à θ_c , où θ_c est défini quand $\theta_2 = 0$:

$$\cos(\theta_c) = n \quad (\text{II-73})$$

Les équations (II-70) et (II-73) donnent :

$$\sin(\theta_c) = \lambda_c \sqrt{\frac{Nb(0)}{\pi}} \quad (\text{II-74})$$

or puisque θ_c est petite :

$$\sin \theta_c = \theta_c = \lambda_c \sqrt{\frac{Nb(0)}{\pi}} \quad (\text{II-75})$$

où λ_c est la longueur d'onde critique, au-delà de laquelle la réflexion est totale

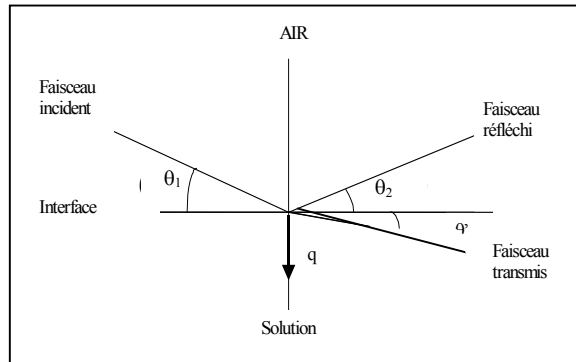


Figure-II.5 : Schéma de principe de l'expérience

2.1.1. Interface parfaite : réflectivité de Fresnel :

En analysant le rapport R d'intensité entre le rayon réfléchi et le rayon incident, en fonction du vecteur d'onde, q , on peut obtenir des informations sur le profil d'indice de réfraction dans l'échantillon près de l'interface.

A l'interface, la réflectivité peut être calculée à partir du profil d'indice de réfraction $n(z)$. Le profil $n(z)$ de la couche interfaciale est divisée en un certain nombre de couches homogènes d'épaisseurs égales. Puis les coefficients de réflexion et de transmission de Fresnel sont calculés pour chaque interface et combinés pour donner la réflectivité totale de la couche d'adsorption.

Comme précédemment, on suppose que chaque interface sépare deux milieux. On sait que l'air a un indice égal à 1 et que le substrat a n , comme indice. La valeur de la réflectivité pour un tel système est appelée réflectivité de Fresnel (R_F):

$$R_F(q) = \left| \frac{q - k_\infty}{q + k_\infty} \right|^2. \quad (\text{II-76})$$

où k_∞ est définis par la relation : $k_\infty = (q^2 - 4\pi (N_{b\infty} - N_{b0}))^{1/2}$.

2.2. Mesures de la Réflectivité de neutrons

Les mesures de réflectivité spéculaire des neutrons ont été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin (LLB Saclay France) sur le réacteur Orphée à flux constant, avec le réflectomètre DESIR (fig.II-6).

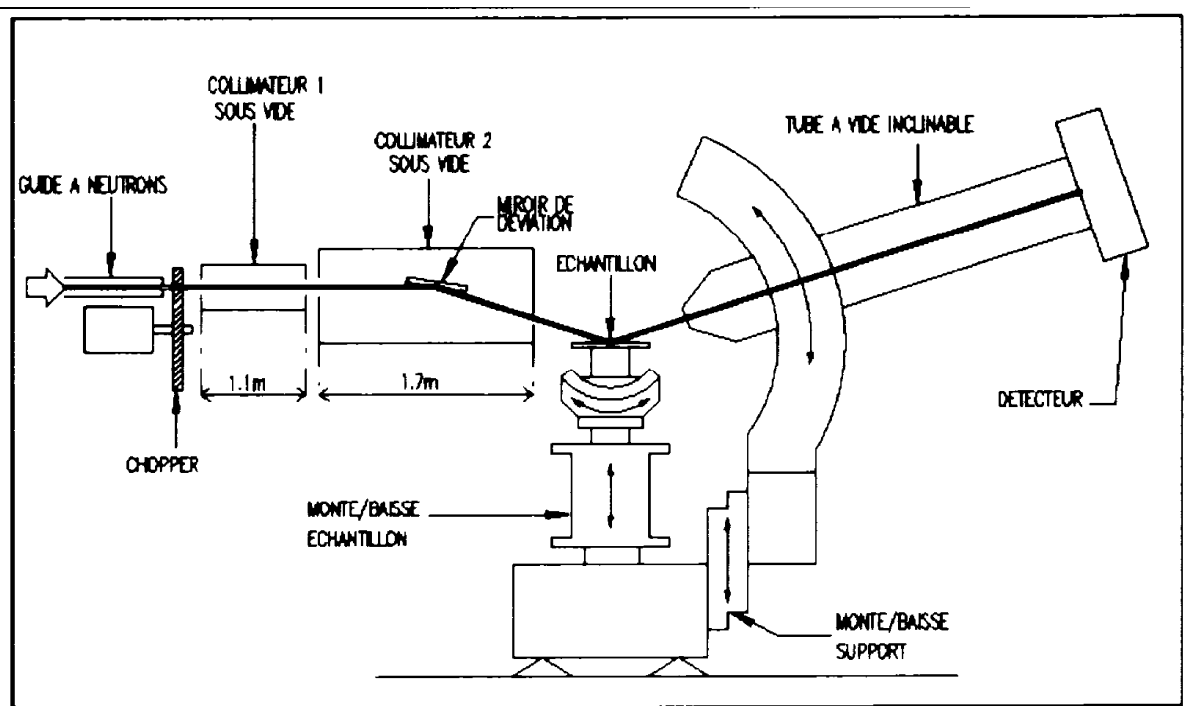


Figure.II-6 : Schéma de principe de réflectomètre DESIR.

2.2.1. Réflectomètre

Les spectres de réflectivité, $R(q)$, ont été obtenus à un angle fixe pour des longueurs d'onde inférieure à λ_c . La valeur de chaque longueur d'onde est déterminée par la technique de temps de vol (TOF).¹²⁹ Cette technique permet de séparer les neutrons d'un faisceau blanc en fonction de leur vitesse. Elle est basée sur la relation de De Broglie selon laquelle le temps t qu'un neutron met pour parcourir la distance L est proportionnelle à sa longueur d'onde associée λ :

$$\lambda = \frac{h}{m_n L} t \quad (\text{II-77})$$

où h est la constante de Planck et m_n est la masse du neutron. Cette relation est équivalente à :

$$\lambda(\text{\AA}) = \frac{t(\mu\text{s})}{252.7 L(\text{m})}. \quad (\text{II-78})$$

avec, $3 \leq \lambda \leq 17.4 \text{ \AA}$

Un dispositif de hacheur permet de former des "bouffées" de neutrons contenant toutes les longueurs d'onde disponibles. Chaque "bouffée" est formée au temps $t = 0$, et la mesure du temps nécessaire aux neutrons pour aller du hacheur au détecteur (distance L) permet de déterminer leur longueur d'onde. La vitesse de rotation du hacheur est telle que les neutrons les plus lents d'une bouffée arrivent avant les neutrons les plus rapides de la bouffée suivante. Cette méthode permet de déterminer la distribution en longueur d'onde des faisceaux incidents et réfléchis.

La divergence du faisceau incident $\delta\theta$ ainsi que la résolution angulaire $\delta\theta / \theta$ sont déterminées par l'ouverture des fentes d'entrée et de sortie du collimateur ainsi que par la longueur du collimateur D_c . Si on néglige l'effet de la gravité terrestre, la trajectoire du faisceau peut être supposée rectiligne (fig-II-7), et alors la divergence est donnée par :

$$\tan \delta\theta = \frac{f_e + f_s}{2D_c} \quad (\text{II-79})$$

Par exemple, le calcul de la divergence et de la résolution pour un angle de 1.5° , des fentes $f_e = f_s = 1\text{mm}$ et pour $D_c = 3890 \text{ mm}$, donne : $\delta\theta = 0.015^\circ$ et $\delta\theta / \theta = 1\%$.

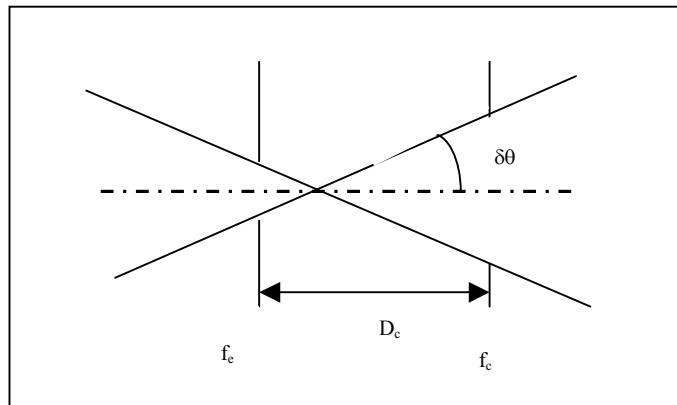


Figure. II-7 : Divergence du faisceau incident lorsque l'on néglige l'effet de la gravité terrestre sur la trajectoire des neutrons.

2.2.2. Conditions expérimentales

Tous les spectres de réflectivité ont été déterminés pendant 8 heures après avoir versé la solution dans la cuve thermostatée pour que l'adsorption atteigne un état de quasi-équilibre. Cette a été lavée par l'acide sulfochromique pour éliminer toutes saletés. Un bruit de fond a été déterminé pour chaque spectre entre 2 et 3 Å où l'intensité du faisceau est pratiquement nulle. Nous rappelons que les expériences sont effectuées en temps de vol : l'angle d'incidence reste fixé à une valeur θ égale à 1.316° avec une incertitude $\Delta\theta$ de 0.035° . Le vecteur d'onde, q , est compris entre 0,017 et 0,095 Å⁻¹.

2.2.3. Détermination du profil de concentration à partir des courbes de réflectivité

Bien que, nous ayons employé la réflectivité de neutrons pour déterminer la structure des couches de protéines adsorbées. Les méthodes permettant de déterminer un profil de concentration à partir d'une courbe de réflectivité sont nombreuses.¹²⁹⁻¹³² Nous ne connaissons pas a priori le profil attendu. Pour traiter les résultats expérimentaux, nous allons utiliser plusieurs modèles susceptibles d'interpréter les courbes de réflectivité obtenues. Les modèles proposés, dépendent d'un certain nombre de paramètres. Ces modèles ne seront acceptables que s'ils permettent d'interpréter correctement ces courbes. En particulier, le profil de la fraction volumique $\phi(z)$ devra être une fonction décroissante continue.

L'algorithme de minimisation de la fonction d'erreur χ^2 est assez. C'est la méthode d'essai échec : On fait varier un paramètre d'une certaine quantité de part et d'autre de sa valeur initiale. Si χ^2 décroît, on remplace le paramètre par sa nouvelle valeur et on boucle successivement sur tous les paramètres, jusqu'à être arrivé à un minimum de χ^2 . Cette méthode est simple à programmer mais le temps de calcul et les risques de blocage sur un minimum relatif croissent rapidement avec le nombre de paramètres.

$$\chi^2 = (\text{Nombre de points expérimentaux})^{-1} \sum_{\text{points expérimentaux}} \frac{(R_{\text{exp}} - R_{\text{calculée}})^2}{\sigma^2(R_{\text{exp}})} \quad (\text{II-80})$$

où σ^2 est l'erreur due à l'appareil.

Les trois différents modèles retenus pour analyser les courbes de réflectivité sont les suivants :

- **Modèle à deux couches :** (figure. II-8)

$$\phi(z) = \phi_1 \text{ si } z < D, \quad (\text{II-81})$$

$$\phi(z) = \phi_2 \text{ si } D < z < L, \quad (\text{II-82})$$

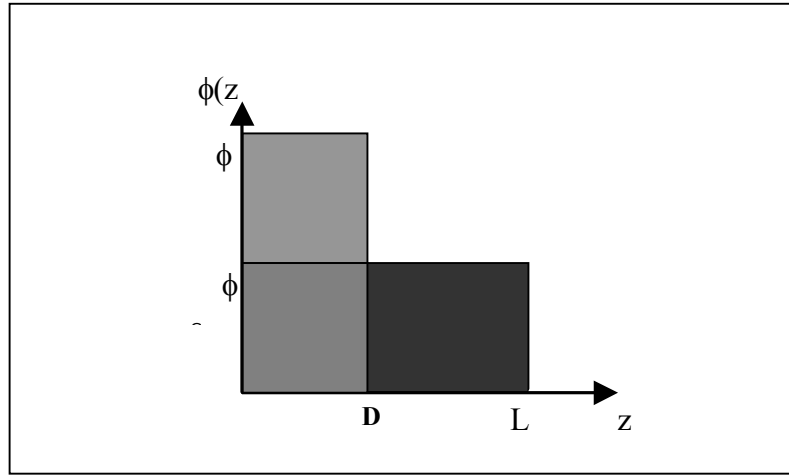


Figure. II-8 : Profil de fraction volumique $\phi(z)$ en fonction de la distance z à la surface. Dans le cas du modèle à deux couches.

- **Modèle à double exponentielle :**

$$\phi(z) = \phi_1 + \phi_2, \text{ si } z < D, \quad (\text{II-83})$$

$$\phi(z) = \phi_1 \exp\left[-\frac{z-D}{d_1}\right] + \phi_2 \exp\left[-\frac{z-D}{d_2}\right], \text{ si } D < z \quad (\text{II-84})$$

Ce modèle dépend de 5 paramètres tels que seuls $\phi_1 + \phi_2$ et D ne dépendent pas de la masse. Ce modèle ne correspond à aucune des prévisions théoriques récentes.

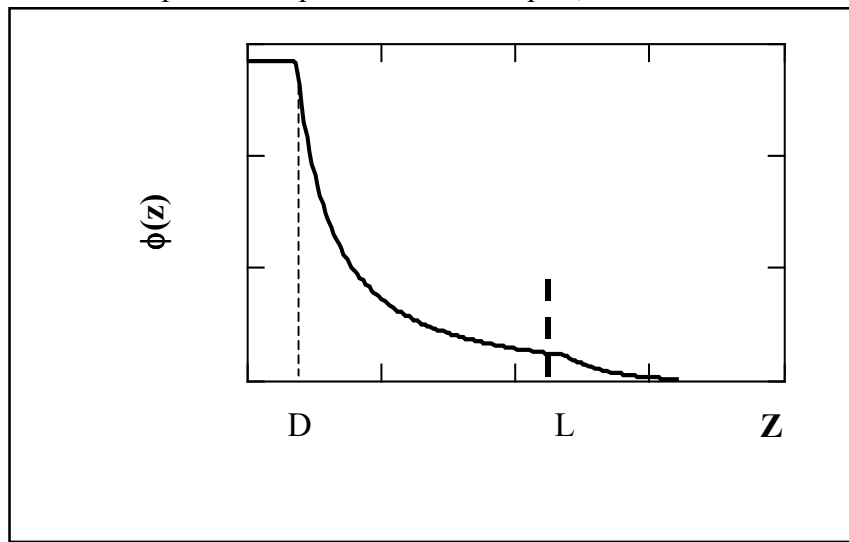
- **Modèle en loi de puissance avec une queue exponentielle¹³³ :**

$$\phi(z) = \phi_s \text{ si } z < D, \quad (\text{II-85})$$

$$\phi(z) = \phi_s \left[\frac{d}{(z-D)+d} \right]^\mu \text{ si } D < z < L \text{ et} \quad (\text{II-86})$$

$$\phi(z) = \phi_s \left[\frac{d}{(L-D)+d} \right]^\mu \exp[-\mu(z-L)] \text{ si } L < z \quad (\text{II-87})$$

Ce modèle correspond aux prévisions théoriques, seulement dans le cas où $\mu = 1.3$,



(figure. II-9).

Figure. II-9 : Profil de fraction volumique $\phi(z)$ en fonction de la distance z à la surface. Présentation du modèle en loi de puissance avec une queue exponentielle. Le trait interrompu représente le début de la queue exponentielle.

2.2.4. Calcul de la densité de longueur : du substrat

Avant de commencer les mesures de spectres, il faut bien analyser et vérifier la propreté du spectre du substrat seul, c'est-à-dire son Nb, et le facteur de normalisation qui permet de positionner le début du spectre, donc il faut avoir un rapport $R(I) / R(I_0) = 1$ (un plateau). Le facteur de normalisation peut être différent de 1 suivant la géométrie du système, il y a perte de faisceau, d'où l'existence d'un facteur de normalisation pour avoir la réflexion totale $R / R_F = 1$. Donc il faut ajuster le spectre du substrat seul avec le programme de simulation des courbes, comparer ainsi la valeur de Nb du substrat théorique et la valeur de Nb mesuré, et vérifier la valeur du facteur de normalisation, figure.II-10.

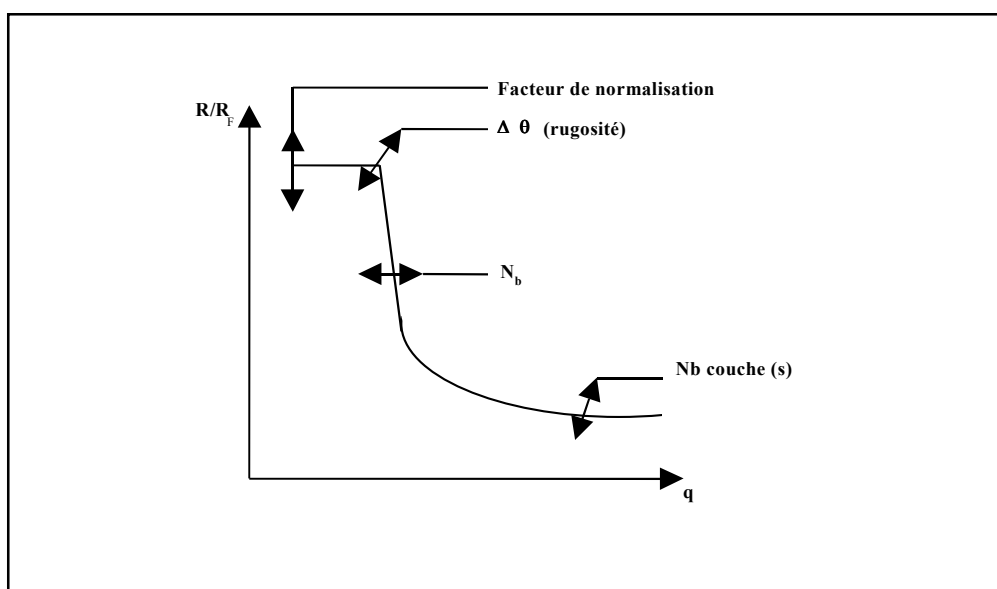


Figure. II-10 : Variation du rapport R/R_F en fonction de la longueur d'onde, λ . N_b représente la densité de longueur de la couche $\Delta \theta$ est la rugosité de l'interface.

2.2.5. Calcul de la densité de longueur de diffusion : de la caséine β

Par exemple pour la caséine β , en connaissant la composition centésimale de la protéine: C (1080), H (1696), O (324), N (269), S (6), P (5), donc à partir du tableau suivant, on peut calculer la longueur de diffusion de chacun des éléments, tableau II-2:

Eléments	b / élément (10^{-12} cm)	b (10^{-12} cm ou 10^{-4} Å)
C(1080)	0.6648	717.984
H(1696)	-0.3741	-634.4736
O(324)	0.5805	188.1792
N(269)	0.930	250.170
S(6)	0.2847	1.7082
P(5)	0.313	1.565
$\sum b$		525.1328
$N_b 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$		1.779

Echange isotopique, entre H (331) libres et le deutérium :

D(331)	0.6674	220.9094
H(1696-331 = 1365)	-0.3741	-510.6465
$\sum b 10^{-4} \text{ Å}$		-289.7371

Après échange isotopique :

$\sum b 10^{-4} \text{ Å}$		$525.1328 - (-634.4736) + (-289.7371) = 869.8693$
$N_b 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$		2.945

Tableau. II-2: Calcul de la densité de longueur de diffusion de la caséine β après échange isotopique.

Or $N_b = \sum b \cdot N_A / V_m$,

N_A , est le nombre d'Avogadro et V_m est le volume molaire, $V_m = V_S M$,

V_S est le volume spécifique (V_S de la caséine β est égale à $0.742 \text{ cm}^3/\text{g}$) et M est la masse moléculaire.

$$\text{- La fraction volumique de la protéine : } \Phi_{\text{protéine}} = \frac{Nb(\text{substrat}) - Nb(\text{couche})}{Nb(\text{substrat}) - Nb(\text{protéine})}. \quad (\text{II-88})$$

$$\text{- La concentration volumique : } C(\text{mg/ml}) = \frac{\Phi_{\text{protéine}}}{V_S} \quad (\text{II-89})$$

$$\text{- La concentration de surface : } \Gamma (\text{mg/m}^2) = C D = \Phi_{\text{protéine}} D. \quad (\text{II-90})$$

4. Tension de surface statique et dynamique

4.1. Mesures de la tension de la surface :

3.1.1. Principe de l'appareil

Les mesures de la tension de surface en modes statique et dynamique, ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre à bulle (fig. II-11) (IT concept, Longessaigne, France).¹³⁴ La tension de surface a été mesurée par l'analyse de la forme d'une bulle d'air formée à l'extrémité recourbée d'une aiguille d'acier inoxydable plongée dans la solution. L'aiguille est fixée sur une seringue contrôlée avec précision par une vis micrométrique et pilotée par un moteur électrique. La bulle est éclairée avec un faisceau de lumière parallèle. L'image est enregistrée par une caméra CCD et est numérisée pour permettre l'analyse de sa forme.

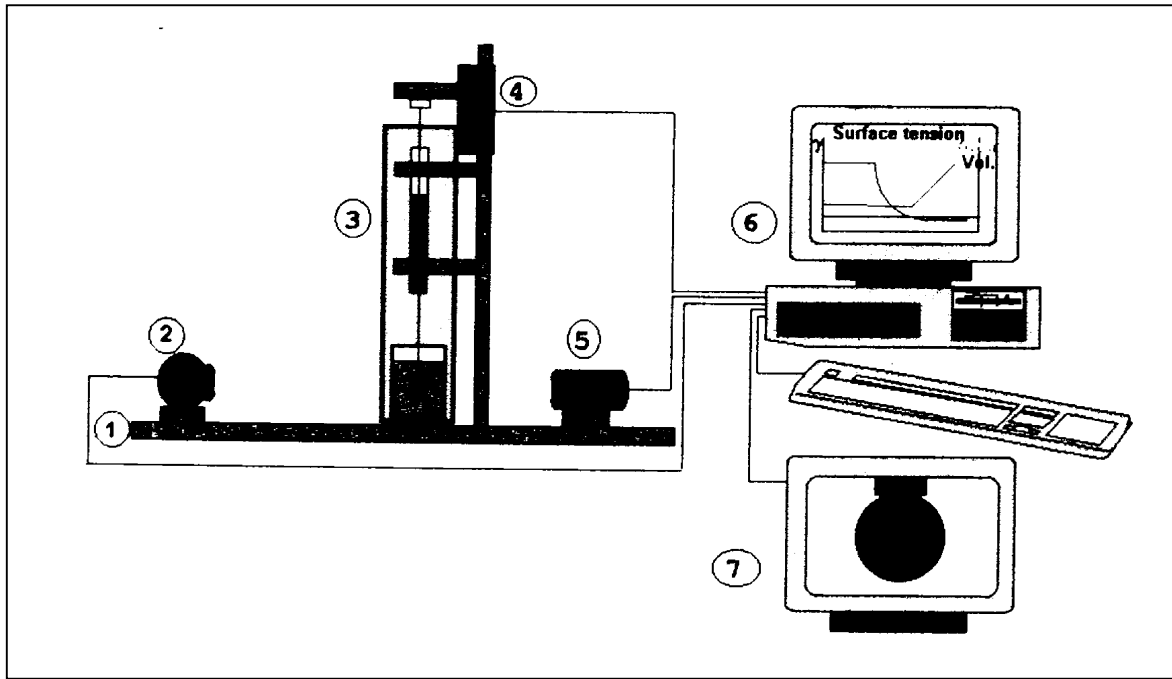


Figure. II-11 : Montage expérimental du tensiomètre à bulle. 1- Banc d'optique, 2-Source lumineuse, 3- Cellule de mesure Thermostatée, 4-Pousse seringue, 5-Optique et caméra, 6- Ordinateur, 7-Ecran de contrôle.

3.1.2. PRINCIPE DU CALCUL DE LA TENSION DE SURFACE

Les mesures de la tension de surface sont basées sur la méthode d'analyse de la forme de bulle à symétrie axiale (ADSA) (fig II-12) dans laquelle le profil expérimental est analysé selon l'équation de Laplace et de l'équation de Laplace-Young (eq.II-91), qui devient en supposant que la bulle possède une symétrie autour de l'axe vertical oz (eq II-92):

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right) \quad (\text{II-91})$$

où ΔP est la différence de pression entre les deux cotés de l'interface, γ est la tension de la surface et R, R' sont les rayons de courbure.

$$\frac{1}{x} \frac{d(x \sin \theta)}{dx} = \frac{2}{b} - g \frac{\Delta \rho}{\gamma} z \quad (\text{II-92})$$

où x et z sont les coordonnées cartésiennes à un point quelconque du profil de la bulle, b est le rayon de courbure à l'apex (tangent) de la bulle ($x = z = 0$), θ est l'angle entre ox et la tangente

du profil de la bulle formé avec l'axe x , g est l'accélération de la pesanteur, $\Delta\rho$ est la différence de la masse volumique entre les deux fluides.

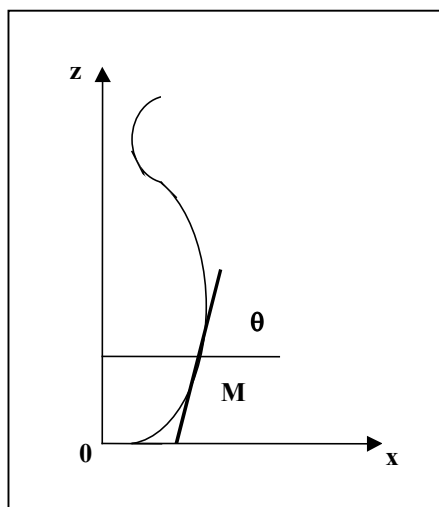


Figure.II-12 : *Profil d'une bulle pendante*

4. PREPARATION DES ECHANTILLONS

4.1. Préparation de la caséine β

La caséine entière du lait écrémé d'une vache homozygote a été utilisée comme produit de départ pour l'isolement de différentes caséines. Elle peut être préparée de différentes façons. Le plus fréquemment elle est obtenue par précipitation isoélectrique. Le pH du lait écrémé, qui peut être dilué avec de l'eau distillée, est alors ajusté à 4,6 à 20°C avec une solution normale d'acide chlorhydrique. Elle peut également être obtenue par sédimentation des micelles, par exemple par centrifugation à 350 g pendant 15 mn à 37°C, après ajustement du pH à environ 6,7 et en présence de 0,07 M CaCl_2 . Ces techniques ont été discutées et comparées par McKenzie.¹³⁵

En raison de l'existence de fortes interactions entre les molécules de caséines, il est nécessaire d'utiliser un agent capable de réduire ces interactions afin de pouvoir fractionner les caséines. Historiquement, l'agent le plus généralement utilisé est l'urée. La caséine totale est ensuite fractionnée en caséines α , β et κ par chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne DEAE 5 PW (Waters, France) avec un système chromatographique liquide moyenne pression (FPLC, Fast Performance Liquid Chromatography), en présence d'urée et en utilisant un gradient de NaCl (de 0 à 0.3 M) dans un tampon imidazole 20 mM, β -mercaptoethanol à

0.3%, à pH 7. Le gradient de sel permet d'éluer les différentes caséines en fonction de la force ionique. Les fractions contenant la caséine β (Fig II-13) sont réunies, dialysées (seuil de coupure 6000-8000) contre le tampon sans sel, puis rechromatographiées dans les mêmes conditions que précédemment. La fraction ainsi repurifiée (Fig II-14) est dialysée contre l'eau ultrapure et enfin lyophilisée et gardée congelée (-20 °C).

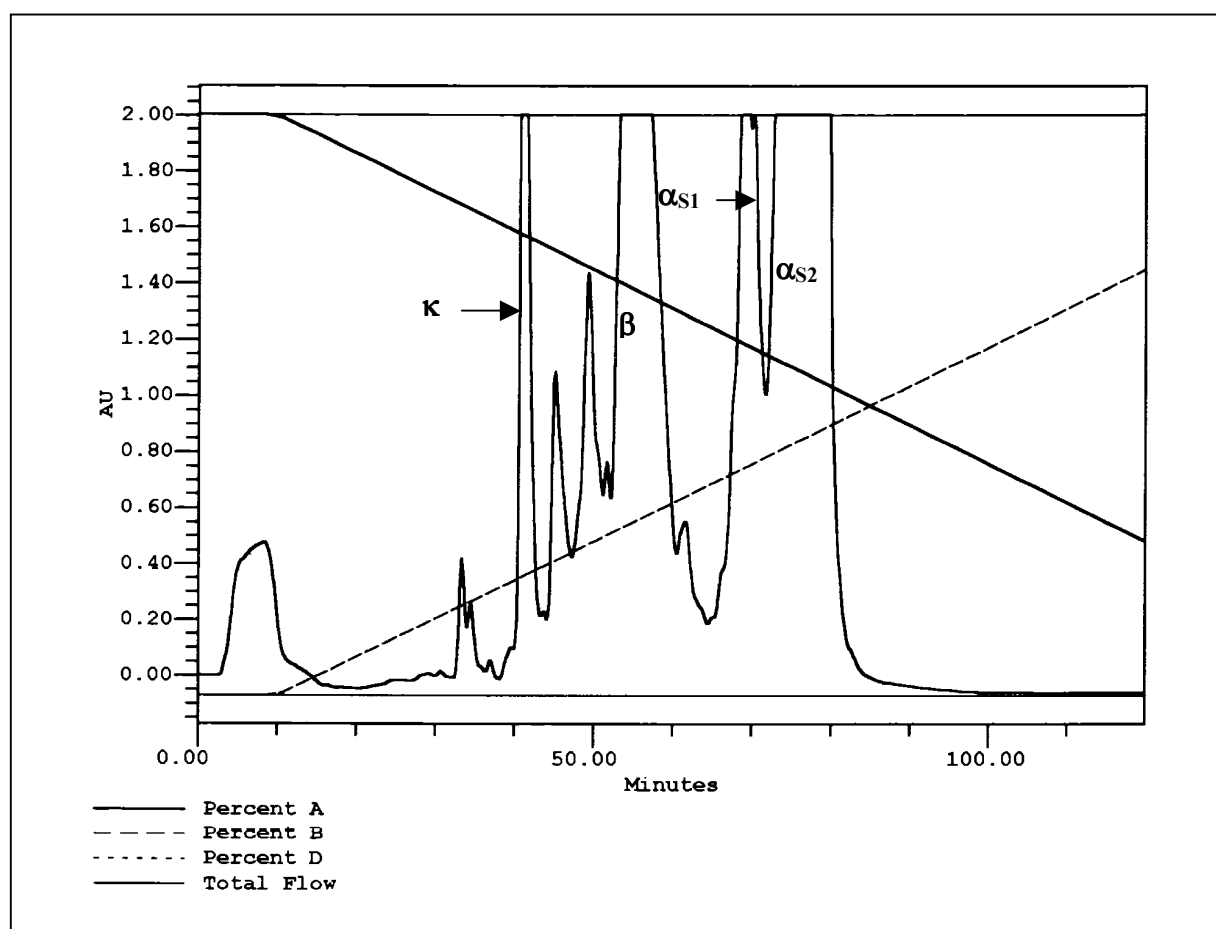


Figure. II-13. Chromatogramme du fractionnement par échange d'ion de la caséine totale du lait de vache. « Percent B » représente le pourcentage de NaCl dans le tampon.

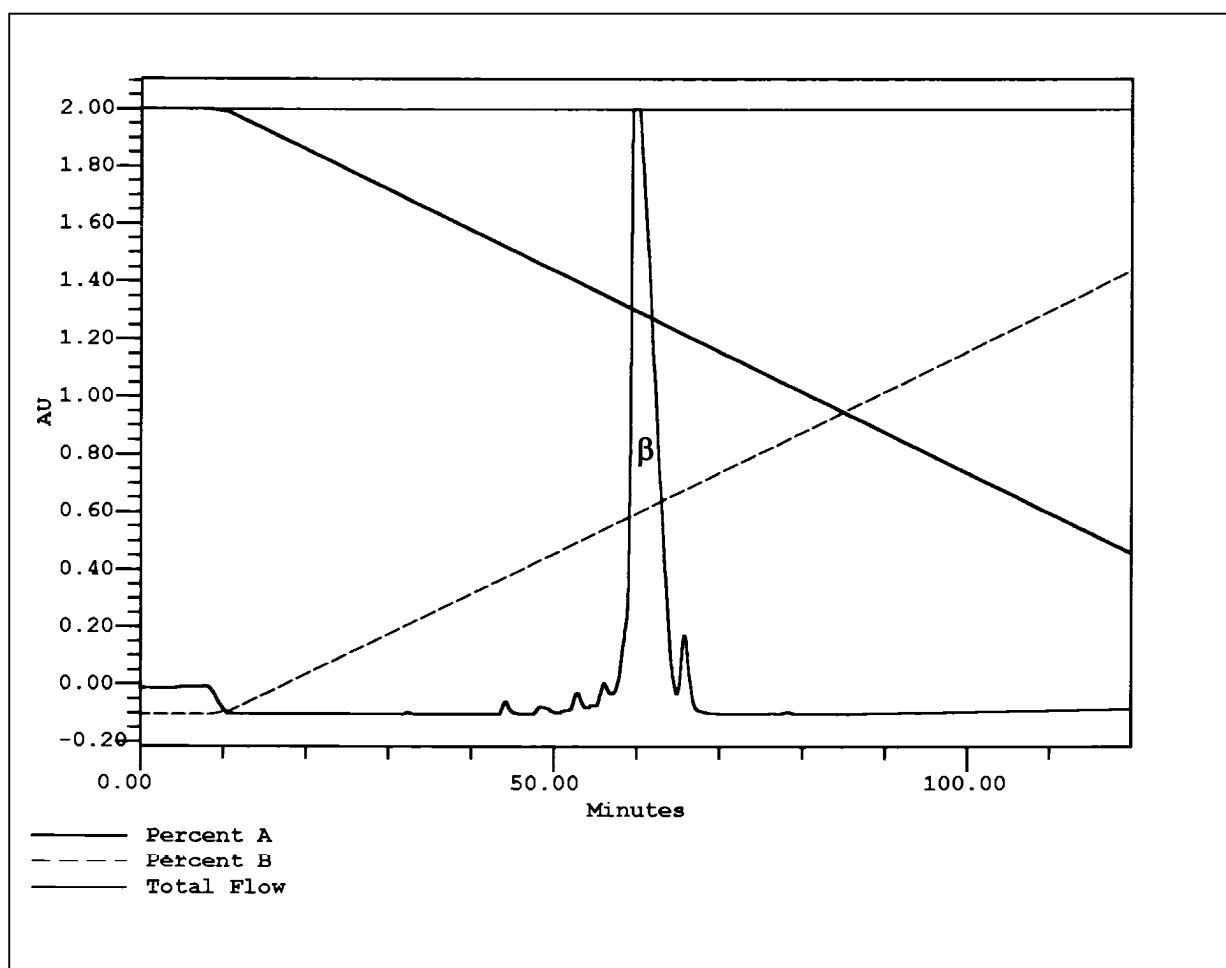


Figure.II-14. Chromatogramme de la purification de la caséine β du lait de vache. « Percent B » représente le pourcentage de NaCl dans le tampon.

4.1.1. Mesure de la concentration

Toutes les techniques spectroscopiques utilisées pour étudier la protéine donnent un signal qui dépend directement de la concentration en protéine. Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent les intensités du rayon diffusée et du rayon réfléchi, le rayon de giration et les épaisseurs des couches d'adsorption sont des quantités très sensibles à la concentration en objets diffusants. Il est donc primordial de bien connaître la concentration exacte de la protéine dans les échantillons qui serviront ou qui ont servi aux mesures. Deux méthodes ont été employées : la première permet de mesurer la concentration en caséine β des solutions mères de protéine en absence de tout dénaturant. La seconde a été utilisée sur tous les échantillons où la caséine β est dénaturée par le chlorure de guanidinium.

En absence de dénaturant, la concentration de caséine β a été mesurée par spectrophotométrie U.V, et à partir de la loi de Beer Lambert, ($\text{Absorbance} = \epsilon l C$) où l est le trajet optique en cm, C , la concentration en protéine en g L^{-1} et ϵ est le coefficient d'absorbance^{.62}, $\epsilon = 0,46 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 278 nm.

Pour les expériences de DNPA et de réflectivité des neutrons, les solutions de caséine β en milieu dénaturant ont été préparées par mélange de proportions variées de tampon et de solutions mères de protéine et de GdmCl concentrées à environ 50 mg cm^{-3} et 8 M, respectivement. Les mélanges ont été fait à l'aide de pipettes ajustables dont le piston est directement placé dans la pointe de prélèvement (pipettes pour PCR) et contrôlés par pesée. La précision sur les concentrations finales est supérieure à 1%.

Dans certains cas (tensiométrie) les concentrations de caséine β en présence de GdmCl ont été simplement déterminées par la méthode de spectroscopie U.V, en variant la longueur d'onde ($250 \leq \lambda \leq 350 \text{ nm}$) insensible à la présence du dénaturant. La mesure de leur absorption à 280 nm permet de déterminer la concentration de caséine β . La précision de ces mesures de concentration est de l'ordre de 1%.

4.1.2. Préparation du chlorure de guanidinium

Pour éliminer certaines impuretés, le chlorure de guanidinium (Pierce) a été recristallisé deux fois dans l'eau pure, filtré et séché sous une hotte à flux laminaire.

Le chlorure de guanidinium deutéré nécessaire aux expériences de diffusion et de réflectivité des neutrons a été obtenu par dissolution d'environ 5 g de sel purifié dans 50 g d'eau lourde, suivie d'un séchage sous vide. L'opération a été répétée quatre fois de suite, ce qui assure une deutériation quasiment parfaite du GdmCl.^{.113} Pour éliminer les poussières, la solution de GdmCl a été filtrée avec un filtre de $0,1 \mu\text{m}$ de porosité au début de la dernière opération. Une solution mère de GdmCl deutérée dans l'eau lourde a ensuite été préparée à une concentration d'environ 8 M.

4.1.3. Mesure de la concentration

Les molarités, $[GdmCl]$, de chlorure de guanidinium dans les solutions ont été déterminées par la mesure de leur indice de réfraction, la conversion étant effectuée à l'aide de la relation donnée par Nozaki.¹³⁶

$$[GdmCl] = 57,141 \Delta n + 3,68 (\Delta n)^2 + 91,6 (\Delta n)^3 \quad (II-115)$$

où Δn est la différence entre l'indice de réfraction de la solution mère de GdmCl et l'eau lourde ou de la solution de caséine β dénaturée et la solution de caséine native à la même concentration en protéine.

4.1.4. Préparation des échantillons pour les expériences

4.1.4.1. Dans l'eau légère

Les solutions mères de caséine β ont été préparées dans un tampon phosphate contenant 0.1 M d'EDTA, 0.02 M d'azoture de sodium et 0.1 M de NaCl, afin de réduire les interactions électrostatiques. Le pH était ajusté à 7. Avant utilisation, ces solutions de caséine β ont été centrifugées pendant une heure à 35000 g pour éliminer les poussières et d'éventuels agrégats.

Les échantillons nécessaires aux diverses expériences ont été préparés aux concentrations souhaitées par dilution à partir des solutions mères. Les concentrations de protéine et de dénaturant ont été, soit déduites des proportions des mélanges, soit mesurées directement comme expliqué dans le paragraphe 4.1.3.

4.1.4.2. Dans l'eau lourde

La caséine β a d'abord été dissoute dans un tampon similaire au précédent mais préparé avec de l'eau lourde. Cette solution a ensuite été dialysée pendant 36 heures contre le même tampon qui a été changé environ 18 heures après le début de la dialyse. Les échantillons ont ensuite été préparés de la même façon que dans l'eau légère.

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. INTRODUCTION

L'objectif de notre travail est d'étudier les structures qu'adopte une protéine (caséine β) en solution et à l'interface air/liquide en absence et en présence d'un dénaturant chimique, le chlorure de guanidinium (GdmCl). Ce dernier a la propriété de diminuer les interactions entre les monomères (acides aminés) de la chaîne polypeptidique.

Dans une première partie, nous avons caractérisé la caséine β en solution par diffusion des neutrons aux petits angles et établi des courbes de transition entre l'état micellaire et l'état de chaîne à volume exclu en fonction de la concentration en GdmCl et de la température.

Dans une seconde partie, nous avons étudié la structure et les propriétés de surface de la protéine à l'interface air/liquide dans les mêmes conditions par des mesures en réflectivité des neutrons et en tensiométrie statique et dynamique. L'interprétation des résultats à l'aide du modèle thermodynamique développé à partir d'un modèle de polymère asymétrique hydrophile/hydrophobe, permet de juger l'importance des conditions de solvants et des interactions entre monomères sur la structure et les propriétés des couches d'adsorption de protéines à l'interface air/liquide.

2. PROPRIÉTÉS D'AGRÉGATION DE PROTÉINES EN MILIEU DÉNATURANT

2.1. Résultats DNPA:

2.1.1. Effet du dénaturant sur la caséine β en solution

Dans les expériences présentées, la concentration de la caséine β est de $7,5 \text{ mg cm}^{-3}$, la température est fixée à 20°C . Les spectres expérimentaux sont présentés dans la figure.III-1 qui montre deux types de formes de spectre. Un type de spectre, correspond aux micelles, où l'intensité à $q = 0$ est très élevée, c'est à dire des fortes interactions. Le second type de spectre correspond aux protéines dépliées (c-à-dire, monomères) (forme aplati).

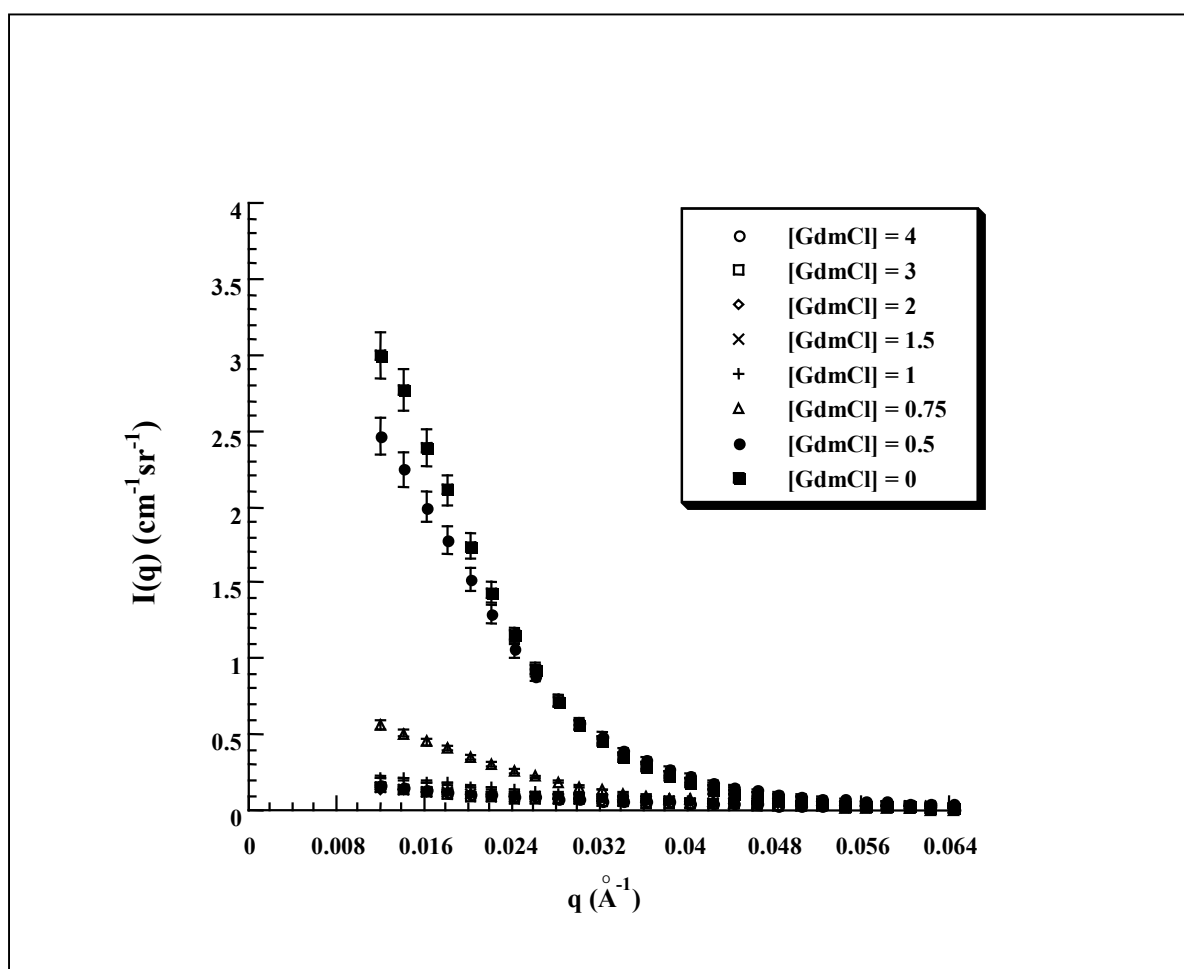


Figure.III-1: Spectres expérimentaux de l'échantillon de caséine β concentré à $7,5 \text{ mg /cm}^3$ pour différentes concentrations de GdmCl, la température est, $T = 20^\circ\text{C}$.

Nous avons remarqué, lorsque la concentration en chlorure de guanidinium dépasse 1.5 M, le domaine de validité de l'approximation de Guinier (figure.III-2) est trop faible, et nous

avons utilisé la loi de "Calmettes", afin de déterminer le rayon de giration et l'intensité $I(0,c)$ de la protéine dénaturée (figures. III-3, III-4a et III-4b). Mais la différence c'est l'une en fonction de la variation de la concentration de GdmCl (Fig.III-3) et les deux autres sont en fonction de la concentration en protéine c (Fig.III-4a, III-4b).

Dans tous ces derniers spectres on a éliminé les deux premiers points, car ils sont affectés d'erreurs et ne sont pas prises en compte dans les analyses.

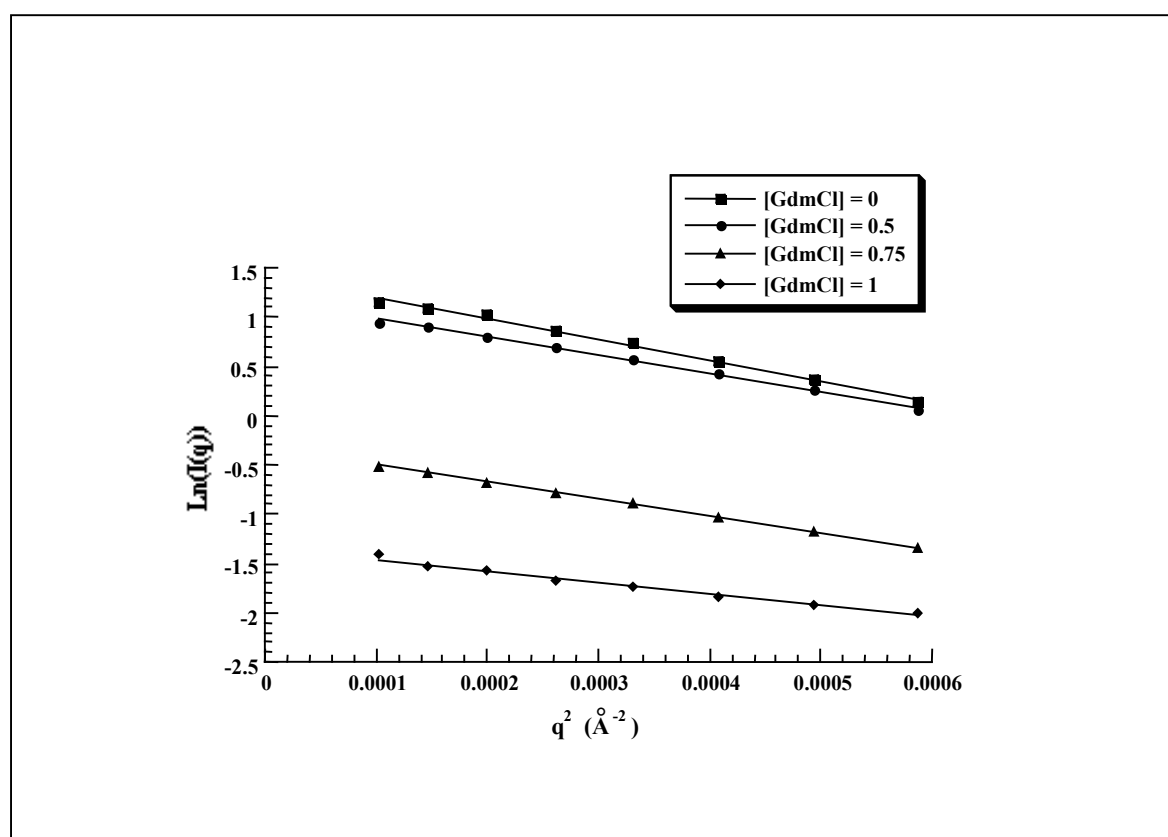


Figure.III-2 : Ajustements réalisés dans l'approximation de Guinier, $qR_g < 1.3$. $c = 7,5 \text{ mg cm}^{-3}$, $T = 20^\circ\text{C}$.

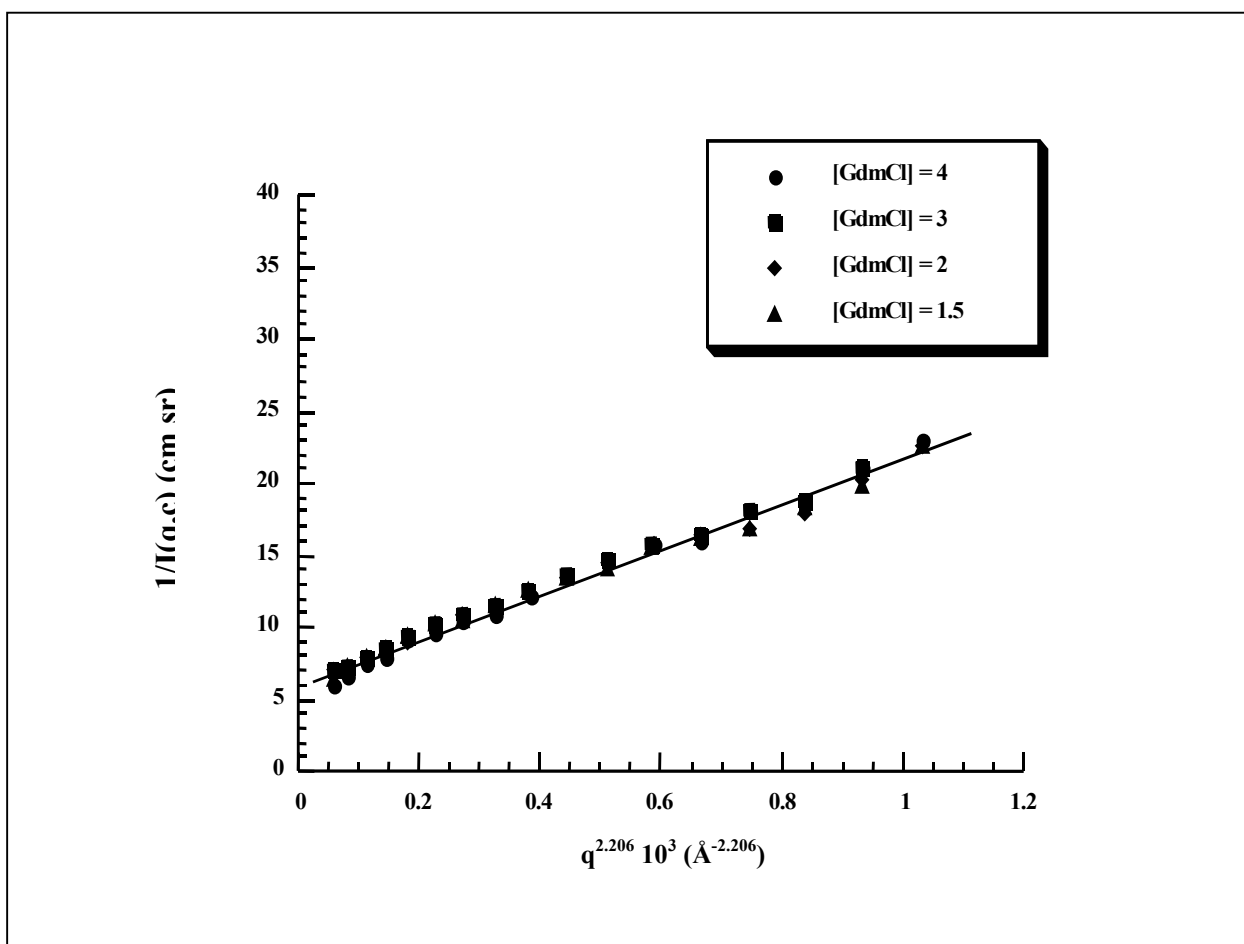


Figure.III-3 : Détermination par l'approximation de "Debye corrigée", $qR_g < 3$, de l'intensité $I(0,c)$ et du rayon de giration R_g de la caséine β dénaturée. $c = 7,5 \text{ mg cm}^{-3}$, $T = 20^\circ\text{C}$.

On a représenté la variation des interactions intermoléculaires par l'intermédiaire de la variation du rayon de giration R_g et la variation du nombre, f , de protéines impliquées par agrégat. Ces trois variations, nous informent sur la structure de la caséine β , (figure.III-5, III-6). Ce nombre f , a été calculé à partir de la relation $f = I_f(0,c)/I_1(0,c)$, avec $I_f(0,c)$ et $I_1(0,c)$ (Chapitre II) sont les intensités extrapolées à $q=0$ de la micelle et des monomère respectivement. La concentration du chlorure de guanidinium, $[\text{GdmCl}] < 3 \text{ M}$, ne change pas le contraste.

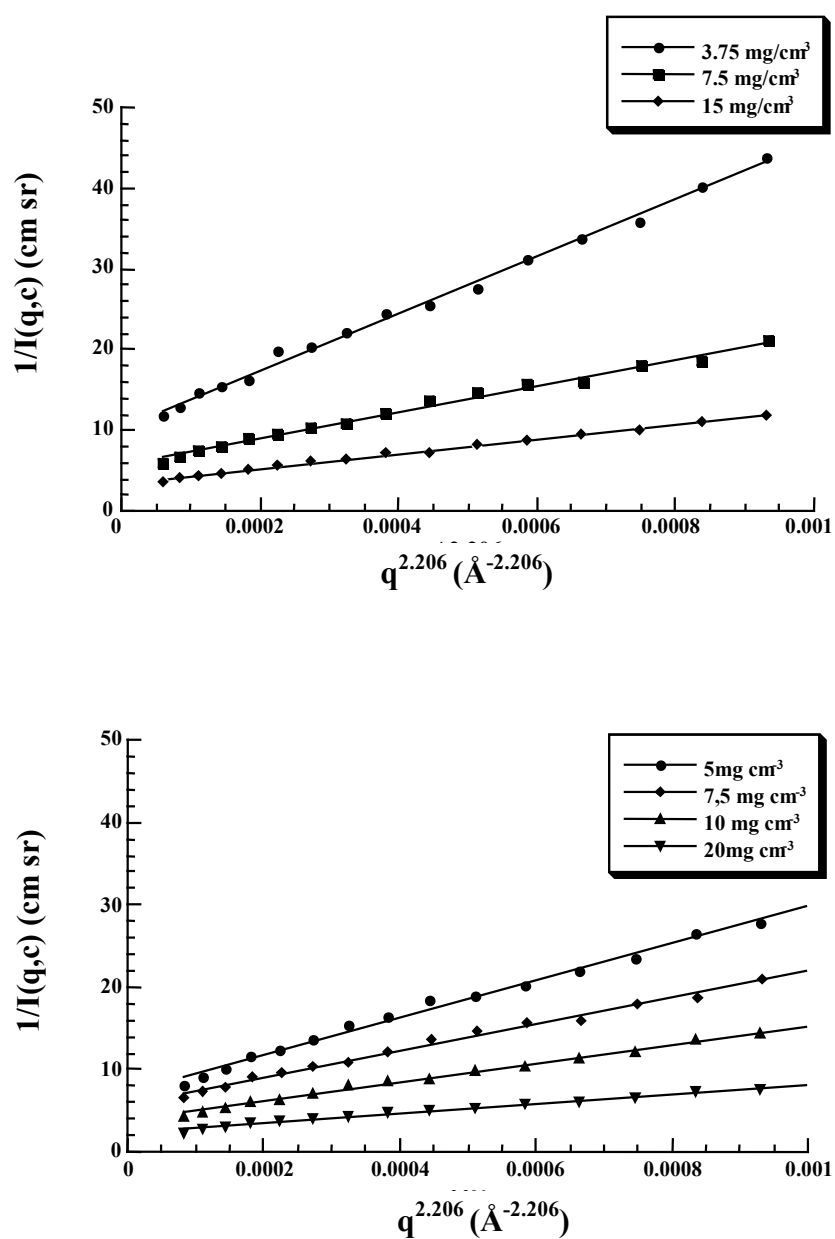


Figure.III-4.a,b : Détermination par l'approximation de Debye de l'intensité $I(0,c)$ et du rayon de giration de la caséine β dénaturée par 3M et 4M de chlorure de guanidinium respectivement pour différentes concentrations en protéine.

A une concentration de chlorure de guanidinium supérieure ou égale à 1.2 M le rayon de giration, et le nombre de protéines impliquées par agrégat restent constant.

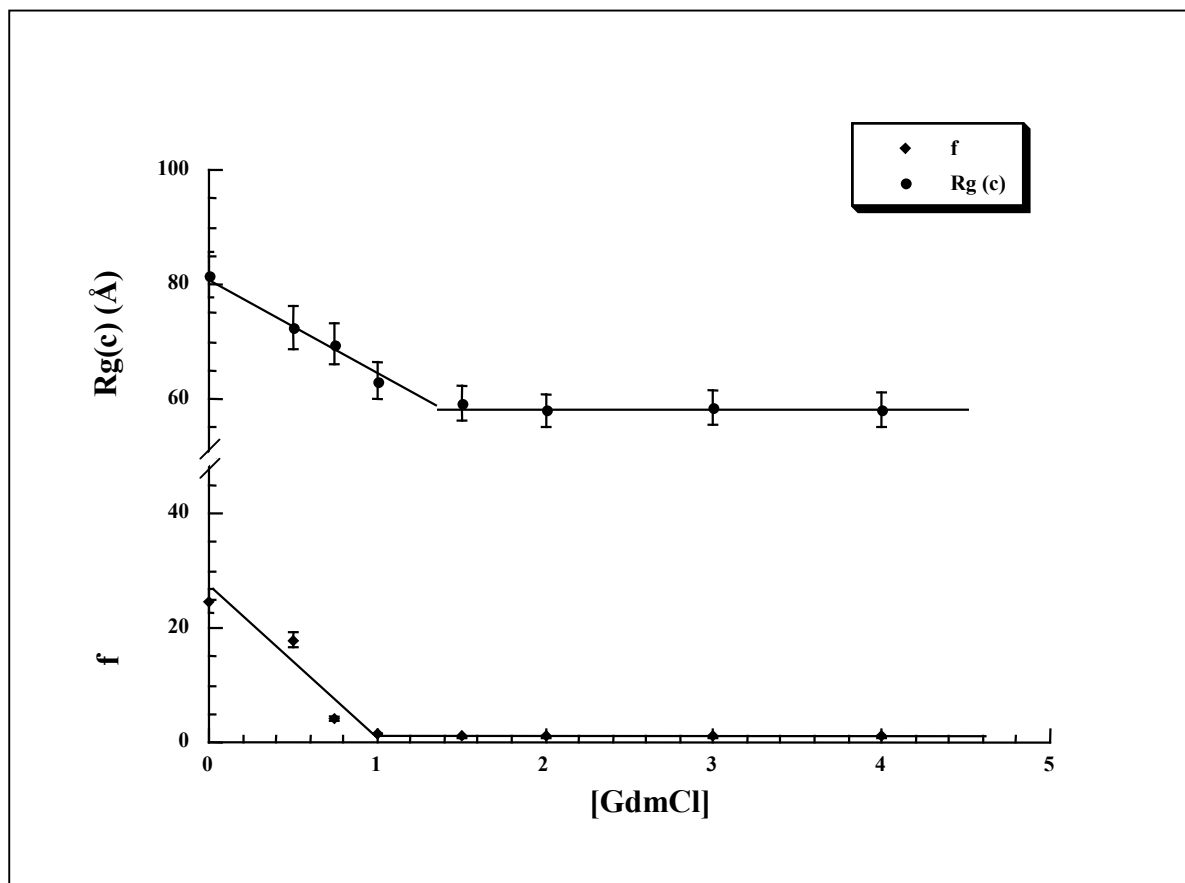


Figure.III-5 : Variation du rayon de giration, $R_g(c)$, et du nombre, f , de protéines impliquées dans un agrégat, en fonction de la concentration en GdmCl. Les lignes droites sont guides pour l'œil.

La présence d'un agent dénaturant comme le chlorure de guanidinium dans la solution augmente de façon significative la concentration micellaire critique CMC. Dans ces conditions, il devient possible de caractériser la structure du monomère de la caséine β .

Les valeurs de $I(0,c)$ en fonction de, c , de la β -caséine sont montrées sur la figure. III-6. Nous avons remarqué que ces valeurs, $c/I(0,c)$ sont différentes et sont égales à 40 et 38.5 ($\text{mg cm}^{-2} \text{ sr}$) pour 3M et 4M de GdmCl respectivement. Cela peut être conclue par le fait qu'on a pas le même contraste entre ces deux concentrations. Donc lorsque la concentration du GdmCl augmente le contraste augmente et vise versa.

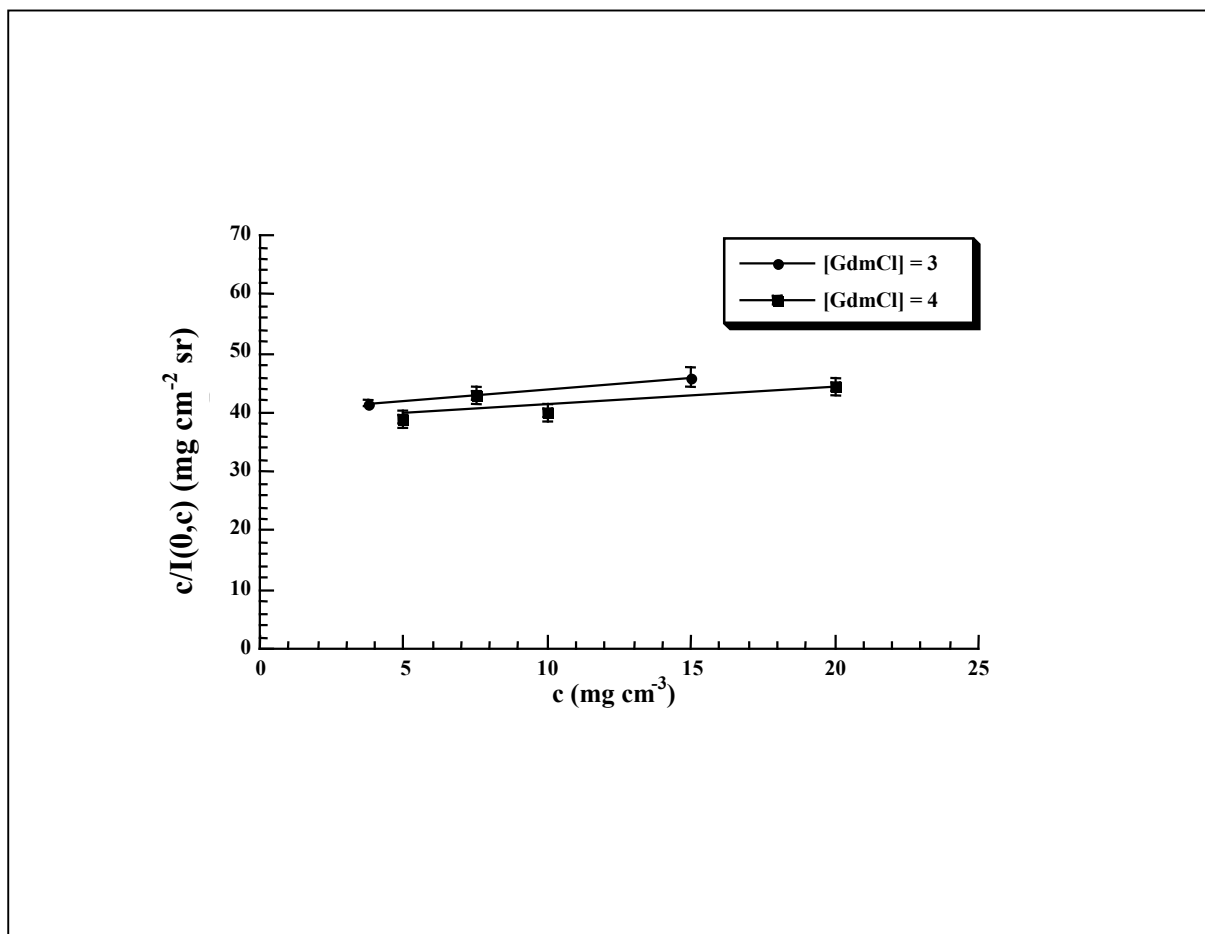


Figure.III-6 : Variation du rapport $c/I(0,c)$ en fonction de la concentration, c , en caséine β à deux concentrations de GdmCl. Détermination de $c/I(0,0)$.

Les valeurs de $R_g(c)$ en fonction de, c , de la β -caséine sont montrées sur la figure. III-7. En utilisant les expressions (II-51) et (II-18), il est possible d'obtenir A_2 et B_2 , tableau.III-1. Mais nous remarquons que les pentes de ces courbes à différentes concentrations de GdmCl sont presque les mêmes surtout lorsqu'on tient compte des erreurs absolues. Or les résultats dans le tableau.III-1 montrent une légère différence cela le fait qu'on a utilisé seulement les valeurs moyennes

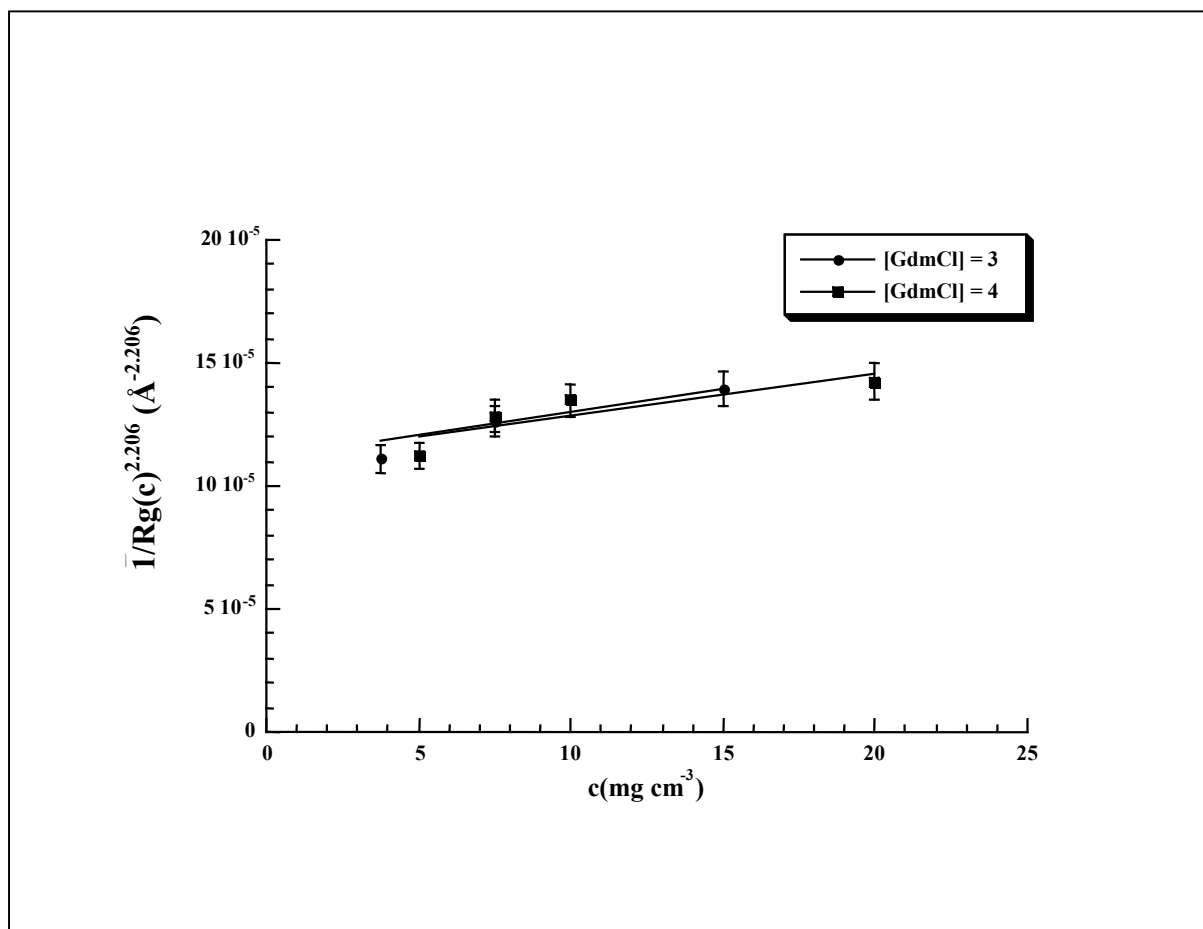


Figure.III-7 : Détermination du rayon de giration de la caséine β extrapolé à concentration nulle R_g .

[gdmCl]	3	4
$A_2 \text{ (cm}^3 \text{ mol g}^{-2}\text{)}$	$(4 \pm 1) 10^{-4}$	$(3 \pm 1) 10^{-4}$
$B_2 \text{ (cm}^3 \text{ mol g}^{-2}\text{)}$	$(3 \pm 1) 10^{-4}$	$(2 \pm 1) 10^{-4}$
$R_g \text{ (Å)}$	62 ± 1	62 ± 1
Ψ	0.072 ± 0.024	0.054 ± 0.024

Tableau.III-1 : Valeurs du second coefficient de viriel et du rayon de giration apparent pour différentes concentrations de protéines.

L'effet de la correction joue un rôle très important pour savoir exactement ce qui se passe au niveau des interactions, à l'échelle globale et locale. Peut être la protéine à 3M ou 4M de chlorure de guanidinium a des interactions globalement répulsives, puisque le second coefficient de viriel A_2 ou B_2 est positif. Or nous remarquons encore que le second coefficients

de viriel est très faible et ces valeurs montrent encore que la protéine est dans état intermédiaire entre un régime où elle est considérée comme une chaîne gaussienne et un autre régime où elle est considérée comme une chaîne à volume exclu. Ceci résume que la protéine n'est pas tout à fait dépliée.

Nous avons prolongé nos travaux par l'étude de la fonction d'interpénétration, ψ . La figure.III-8, représente la variation de ψ , en fonction de du rapport $(\alpha_s^3)^{125}$, où $\alpha_s = Rg^{\text{vol exclu}} / Rg^{\text{gaussienne}}$. Cette figure est prise à titre comparatif, puisque, la fonction Ψ peut avoir des différents cas possibles. ψ tends vers 0 cela indique encore que la protéine est considérée comme une chaîne presque idéale.

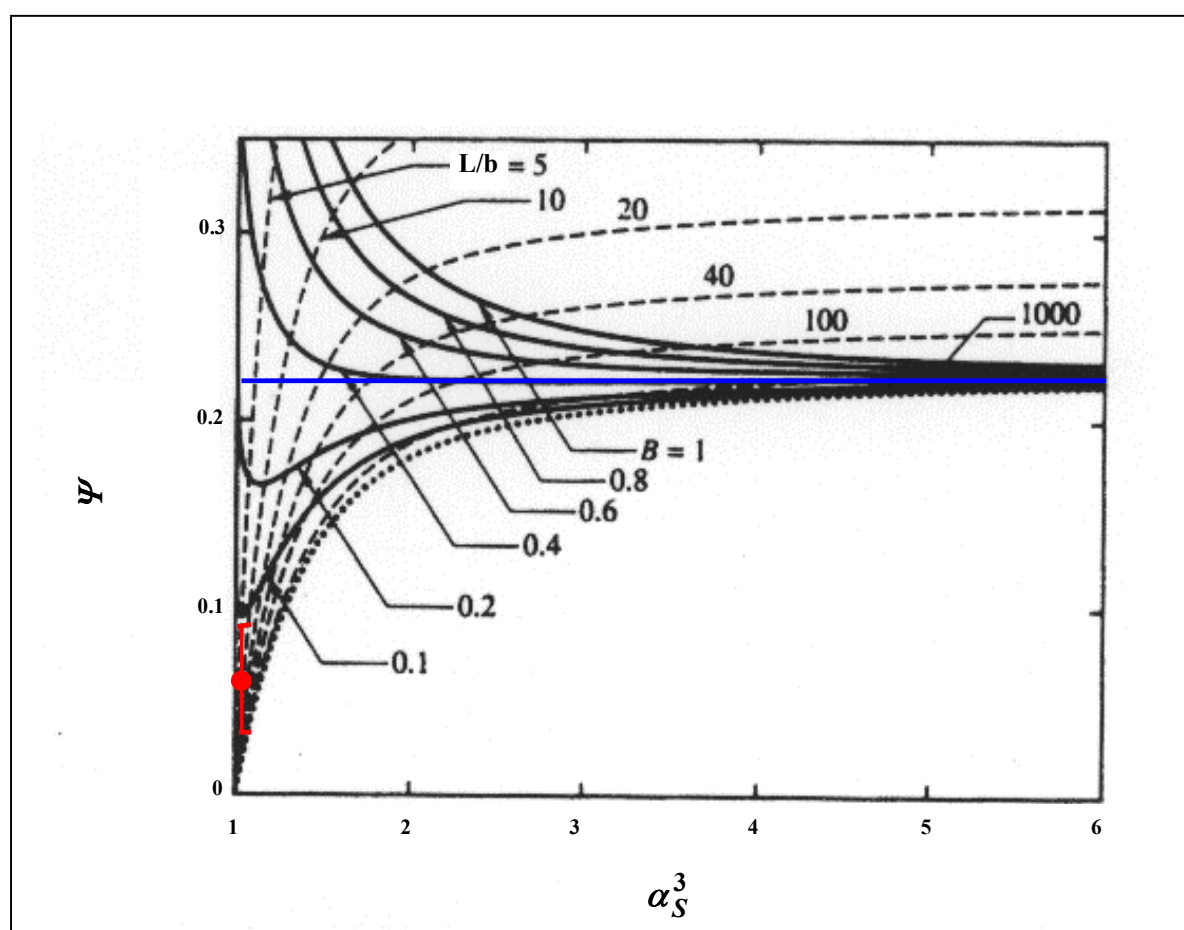


Figure.III-8 : Variation de ψ en fonction de α_s^3 , B représente la portée des interactions de volume exclu et L/b est le rapport de la longueur d'une chaîne étirée, L par la longueur statistique, b . La ligne bleue représente l'état d'une chaîne à volume exclu. Le point rouge représente les résultats expérimentaux pour la caséine en présence de 3 et 4M du chlorure de guanidinium.

2.1.2. Interactions de volume exclu

Pendant longtemps, il a semblé que l'expérience se devait de confirmer la valeur de l'exposant ν donnée par Flory, à savoir $\nu = 0.6$. Cette valeur était comparée à la valeur $\nu = \frac{1}{2}$ associée à la chaîne Gaussienne. Lorsque la théorie moderne a proposé, en 1977 la valeur $\nu = 0.588$, il paraissait impossible de trancher par l'expérience entre cette nouvelle et celle de Flory.

Dans le régime de gonflement asymptotique, et à partir de l'équation (II.23) nous avons déterminé l'exposant ν qui caractérise la structure fractale et la constante universelle $P\infty$. Délimitons tout d'abord l'intervalle d'espace réciproque q ($3 \leq qR_g \leq 2 R_g/b$) dans lequel cette loi est valable (figure.III-9).

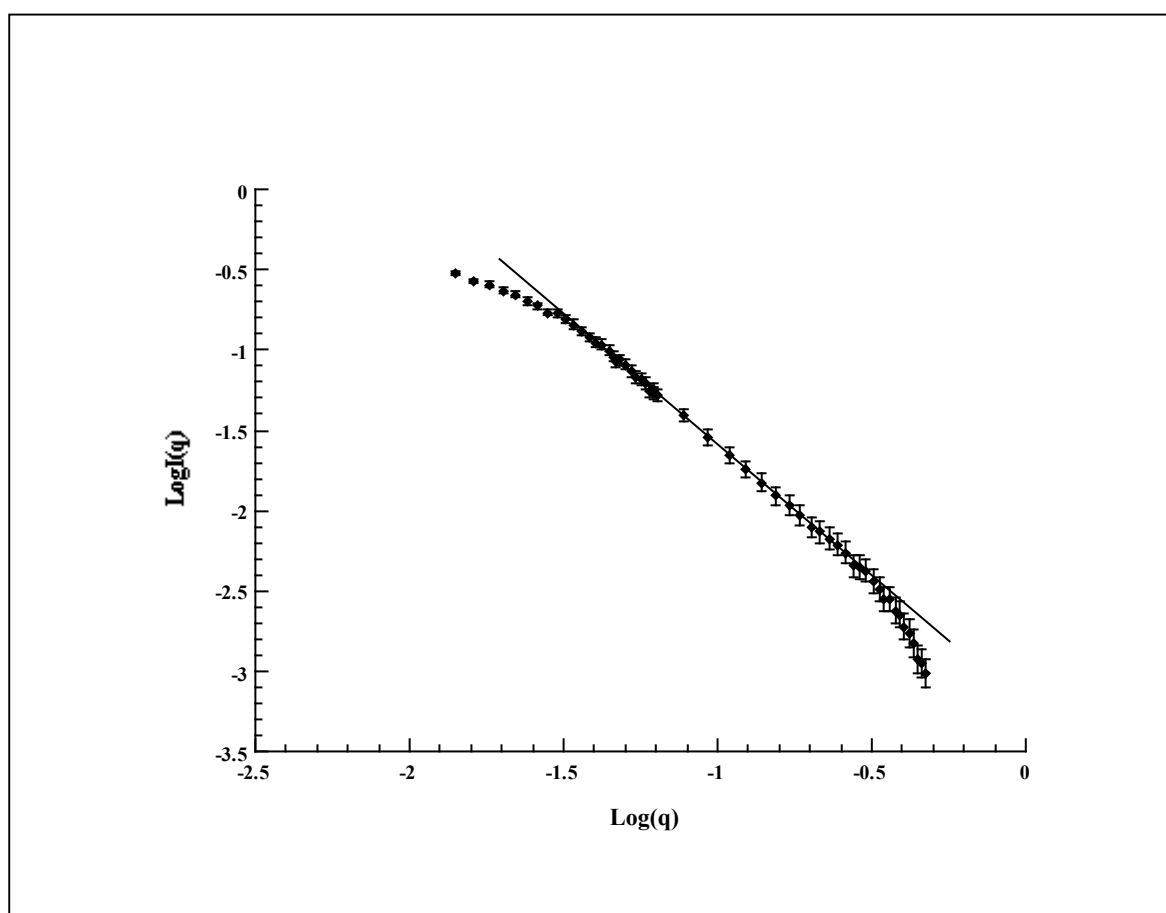


Figure.III-9 : *courbe de diffusion en représentation logarithmique de la caséine β (15mg cm^{-3}) présence de 3M de GdmCl et détermination des paramètres universels $P\infty$ et ν dans la zone des q intermédiaires $3/R_g < q < 2/b$.*

La détermination des paramètres universels P_∞ et v nous ont donné les valeurs suivantes :

$P_\infty = 1.3 \pm 0.2$ cette valeur peut être égale à 1.2 si on tient compte du changement du contraste dû au chlorure de guanidinium.

$v = 0.584 \pm 0.016$.

La détermination de ces deux facteurs permet de connaître la nature des interactions. Des Cloizeaux et Duplantier¹³⁷ ont calculé théoriquement P_∞ et ont obtenu la valeur assez approximative : $P_\infty = 1.04$. Rappelons que pour une chaîne gaussienne, $P_\infty = 2$ et $v = 0.5$, pour une chaîne à volume exclu $P_\infty = 1.3$ et $v = 0.588$, par contre Pedersen et. Al.¹¹⁸ ont montré que ce pré-facteur vaut 1.22 pour une chaîne à volume exclu. Donc la caséine β en présence de 3M de chlorure de guanidinium se comporte comme un polymère à volume exclu. Il existe donc des répulsions à longue distance à l'intérieure de la chaîne polypeptide, interdisent le contact entre les segments d'acides aminés. Mais dans notre cas et comme nous avons dit précédemment que la gamme des q , ($3 \leq qR_g \leq 2 R_g/b$) est faible. On ne peut pas confirmer le fait que la protéine soit considérée comme une chaîne gaussienne ou à volume exclu, surtout si la chaîne a un second coefficient très faible.

2.1.3. Chaîne de Kratky et Prod :

A titre explicatif nous présentons dans la figure.III-10, la différence entre une courbe ajustée, en tenant compte de l'effet de la concentration et une courbe sans tenir compte de l'effet de la concentration. Le meilleur ajustement est obtenu en tenant compte des effets de la concentration (courbe 1).

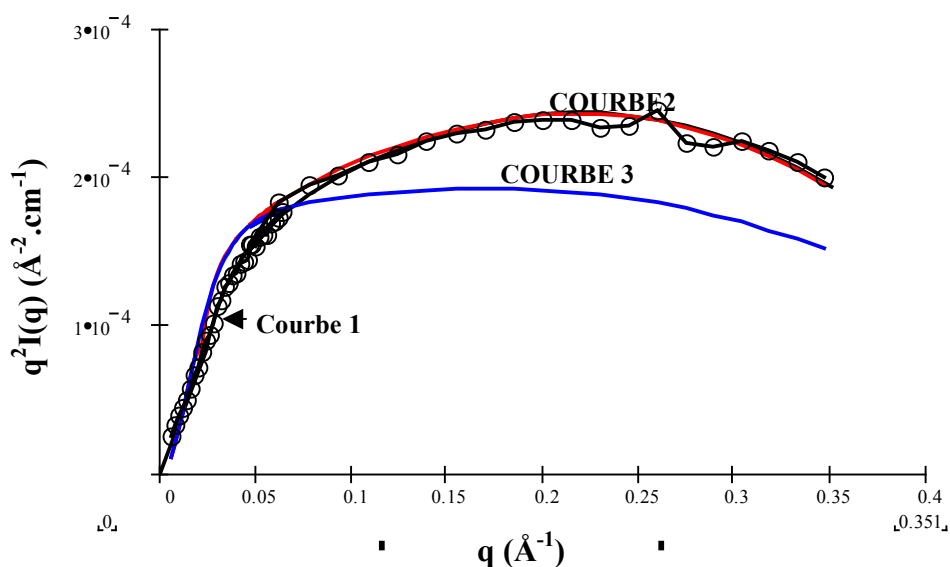


Figure.III-10 : Courbe de diffusion en représentation de Kratky de la caséine β , concentrée à 10 mg cm^{-3} , dénaturée par 4M de chlorure de guanidinium et ajustement aux points expérimentaux. (courbe après et avant les corrections, (effet de la concentration)). Tous ces courbes sont prises avec les mêmes L , b et R_c .

- Courbe. 1 est ajustée par les équations de Pedersen et al. en tenant compte de l'effet de la concentration.
- Courbe. 2 est ajustée par les équations de Pedersen et al. sans tenir compte de l'effet de la concentration.
- Courbe. 3 est ajustée par l'équation de Sharp et Bloomfield $\times \exp(-q(R_c)^2/2)$.

La figure.III-11, montre un exemple d'ajustement à partir de l'équation (II-37) d'une courbe de diffusion de la caséine β à 15 et 20 mg cm^{-3} , dénaturée par 3 et 4M de GdmCl respectivement.

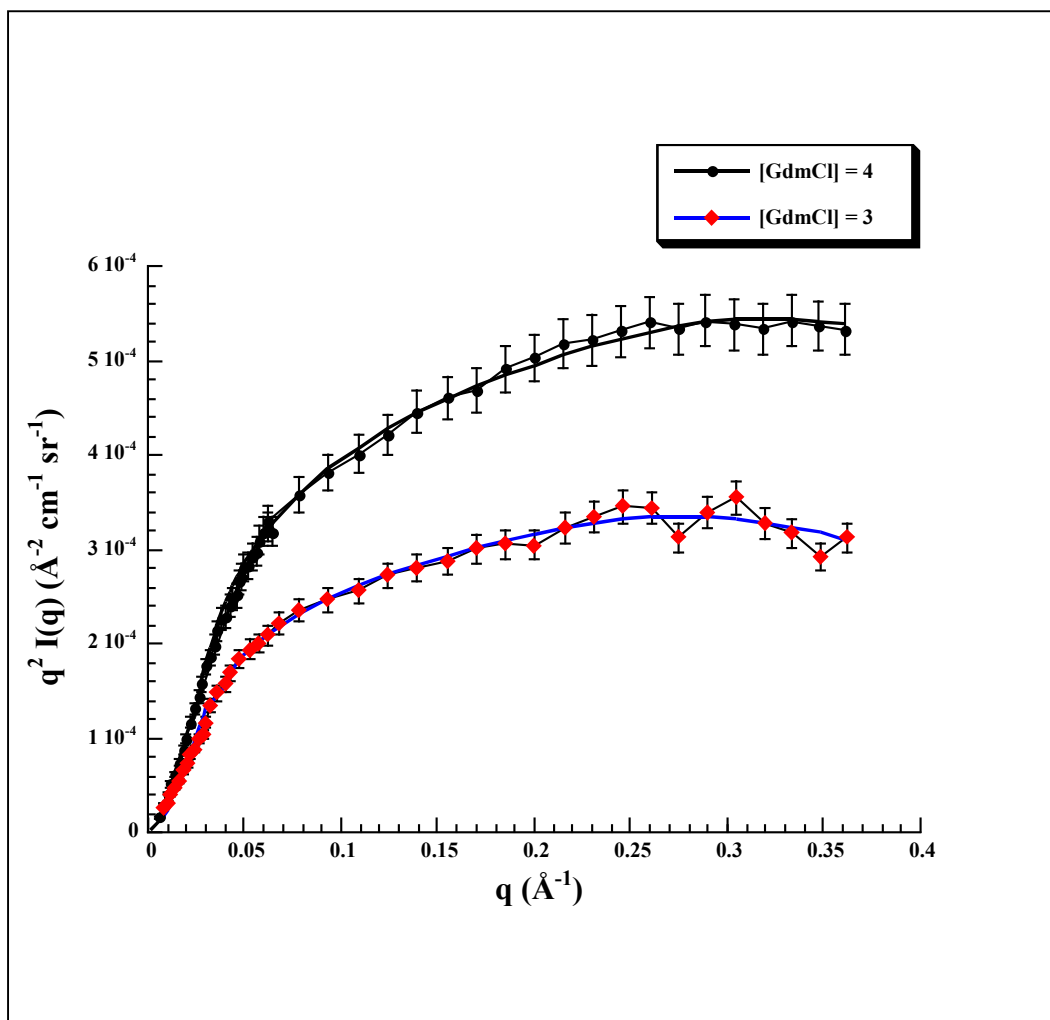


Figure.III-11 : Courbe de diffusion en représentation de Kratky de la caséine β , dénaturée par 3 et 4M de chlorure de guanidinium et ajustement par l'équation (II-37) aux points expérimentaux. (courbe après correction d l'effet de la concentration).

[GdmCl]	3	4
L (Å) (fixe)	720	720
b (Å)	21 ± 1	17 ± 1
R_C (Å)	4.6 ± 0.2	3.9 ± 0.2

Tableau.III-2 : Valeurs de la longueur du contour, L (fixé), d'une chaîne étirée, du rayon de giration transverse R_C , et de la longueur statistique, b.

Ces résultats sont obtenus en fixant la longueur de la chaîne étirée à 720 Å et en ajustant tous les points expérimentaux par le modèle théorique. Mais le problème qui se pose, c'est que

le modèle de Pedersen et. al n'est pas bien applicable pour la faible zone de q ($q_b < 3.1$) "même si l'écart entre la courbe expérimentale et la courbe théorique est très faible" car nous avons remarqué que le rayon de giration pour une chaîne gaussienne $((Lb/6)^{1/2})$ est très faible et égale à 50.2 pour 3M de GdmCl et 45.2 Å pour 4M de GdmCl, cela implique que $(\alpha_s)^3 = 1.37$ et 1.88 et avec, $\psi < 0.1$ dans les deux cas respectivement. Ces résultats ne peuvent pas être présentables dans la figure II.8 même si la chaîne est considérée comme idéale. Or l'idée qui se pose c'est d'ajuster ces deux courbes expérimentales sans fixation de $L = 720$ Å et seulement les valeurs de q élevées, c.à.d, $q_b > 3.1$. Dans cette zone de q , la structure de la protéine est influencée par l'aspect locale et cela veut dire qu'on est proche de la réalité des valeurs mesurées. Le tableau.III-2 devient :

[GdmCl]	3	4
L (Å)	719.3 ± 0.7	718.5 ± 1.5
b (Å)	31.5 ± 0.5	30.0 ± 0.5
R_C (Å)	5.38 ± 0.05	4.65 ± 0.05
α_s^3	1.027	1.107

Tableau.III-3 : Valeurs de la longueur du contour, L , d'une chaîne étirée, du rayon de giration transverse R_C et de la longueur statistique, b .

Ces résultats sont cohérents (Tableau.III-3), pour une chaîne peptide de 209 résidus d'acides aminés. La distance entre deux carbones α à peu près égale à 3.45 Å, la longueur de contour de la caséine β tend vers 720 Å. Désormais la chaîne est considérée comme une chaîne idéale si on compare nos résultats avec ceux de Yamakawa Figure.III-8. Encore on peut conclure que 4M de GdmCl est assez faible pour déplier la caséine β , même si v mesurée expérimentalement égale 0.584.

Encore, le résultat précédent montre, lorsque la caséine β dénaturée par une forte concentration de chlorure de guanidinium, ne présente pas des structures résiduelles. On peut donc dire que le dénaturant déstabilise la structure de la protéine et élimine les interactions résiduelles locales. Finalement, la valeur du rayon de giration transverse R_C dépend de la

distribution radiale des longueurs de diffusion associées aux différents atomes de la chaîne polypeptide⁹² (Calmettes) et du solvant.

2.2. Etude des Micelles :

2.2.1. Introduction:

Aux températures près de l'ambiante une partie des acides aminés de la chaîne de caséine β n'est plus soluble dans l'eau. Le caractère amphiphile résultant de la caséine β mène à la formation de divers agrégats. Pour les domaines des matériaux auxquels la caséine β appartient, les agrégats sont sous forme de micelles, c.-à-d., les agrégats sont sous forme de noyau vraisemblablement dominé par des acides aminés hydrophobes et entouré par une couronne composée d'acides aminés hydrophiles. A une température donnée, les micelles sont dans l'équilibre thermodynamique avec les monomères de caséine β .

2.2.2. Résultats

Figure.III-12, montre la variation de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde, q , pour différentes températures et pour une concentration de caséine β égale à $7,5 \text{ mg cm}^{-3}$ en présence de 1 M de chlorure de guanidinium. Ce choix de concentration de GdmCl est de voir le processus d'agrégation à partir d'un monomère. Encore 1M représente à peu près la zone de transition entre un état micellaire et un état où la protéine se comporte comme un monomère. La fonction de diffusion mesurée est dominée par les grands agrégats, parce que la diffusion d'un objet est proportionnelle à la masse, M .

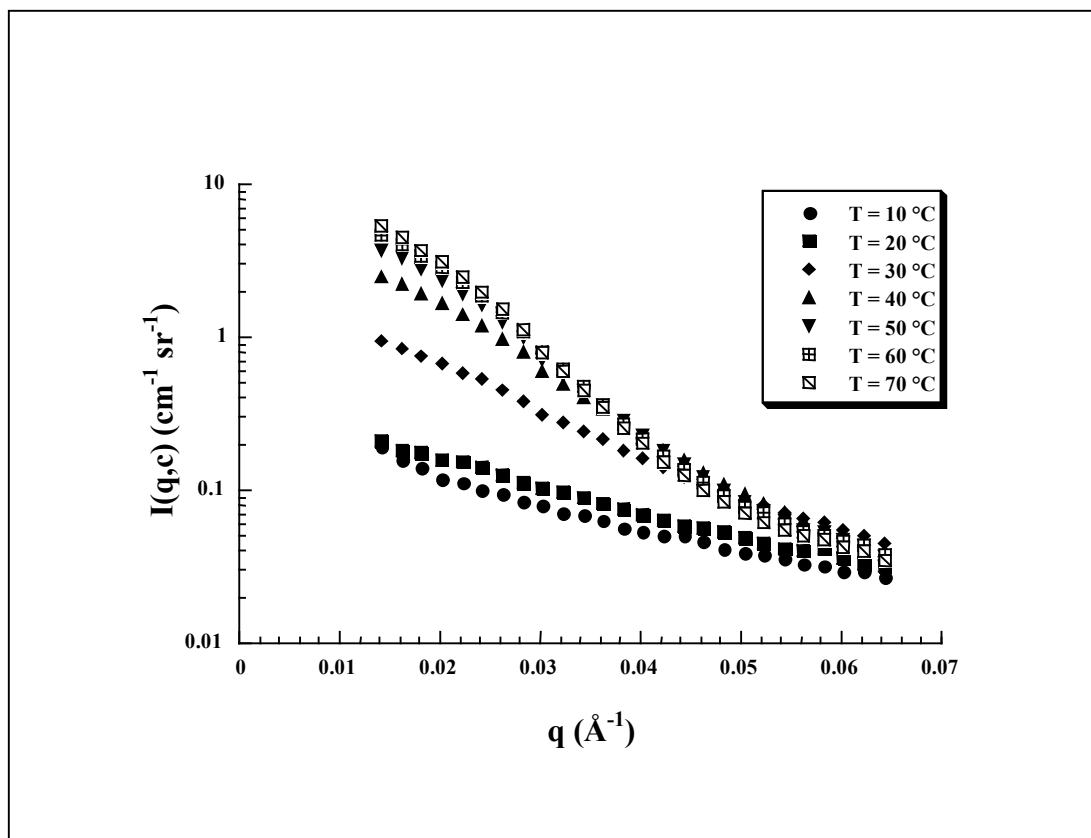


Figure.III-12 : Variation de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde, q , et en fonction de la température, T . $c = 7,5 \text{ mg cm}^{-3}$ et $[GdmCl] = 1$.

Figure.III-13, montre la variation du rayon de giration, R_g et du nombre de protéines impliquées par agrégat, f en fonction de la température. Ces résultats sont calculés en négligeant A_2 ($A_2 \cong 0$)³¹. A basse température (10-20°C), ces derniers sont constants. Le rayon de giration et le nombre f augmentent et représentent la phase d'agrégation.

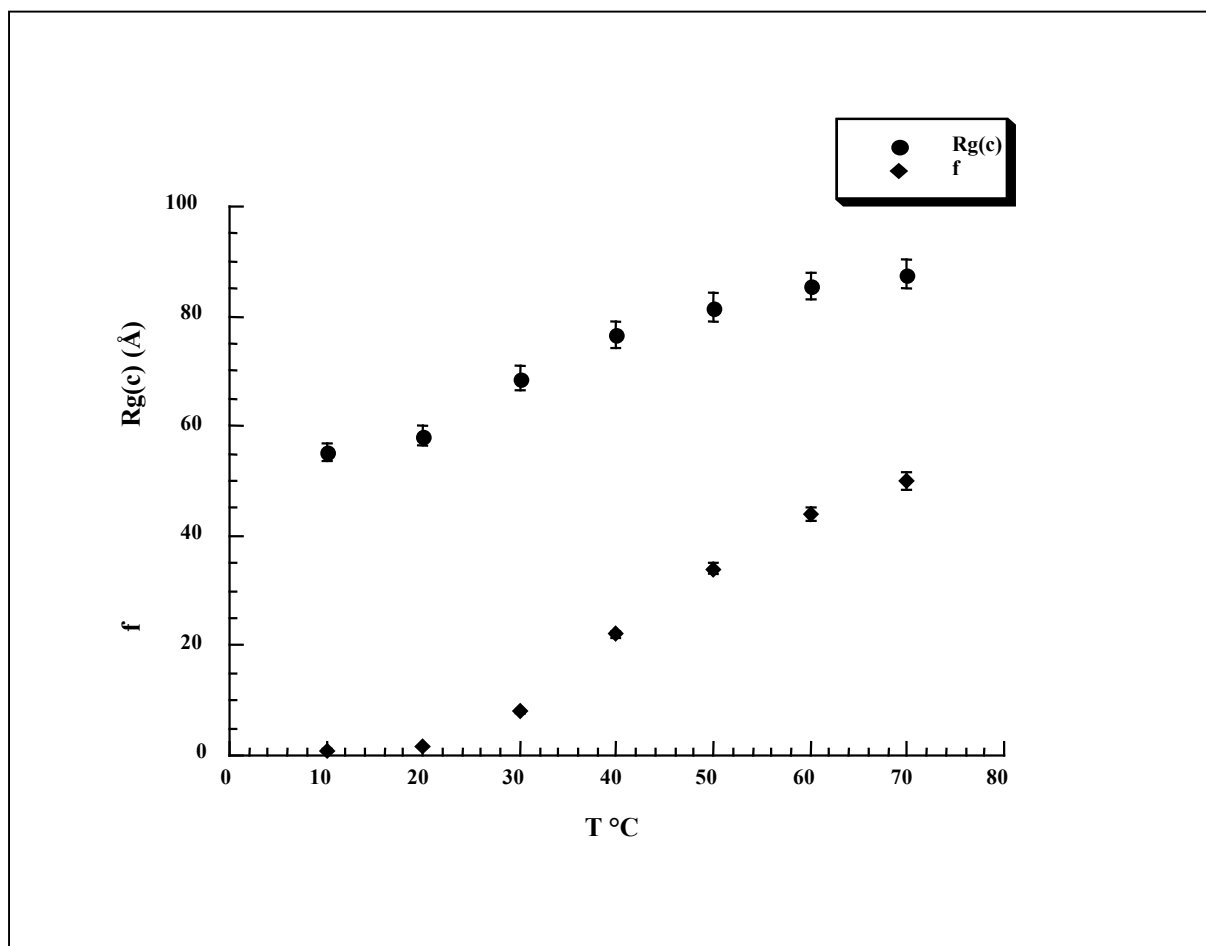


Figure.III-13 : Variation du rayon de giration, $Rg(c)$ et du nombre de protéines impliquées par agrégat, f , en fonction de température T . $c = 7,5 \text{ mg cm}^{-3}$

2.2.3. Etude locale et globale des micelles de caséine β :

D'excellents ajustements sont obtenus par la fonction (II-56) à l'intensité diffusée expérimentale. Ceci est montré dans un exemple typique, donné par la figure.III-14. La ligne continue dans cette figure représente cet ajustement. Dans ce cas là nous avons limité l'intervalle de q à $0,006-0,06 \text{ Å}^{-1}$. Dans ce domaine, on n'est pas dans le régime asymptotique ou $I \propto q^{-1/\nu}$ (couronne) ni dans le régime de Porod.

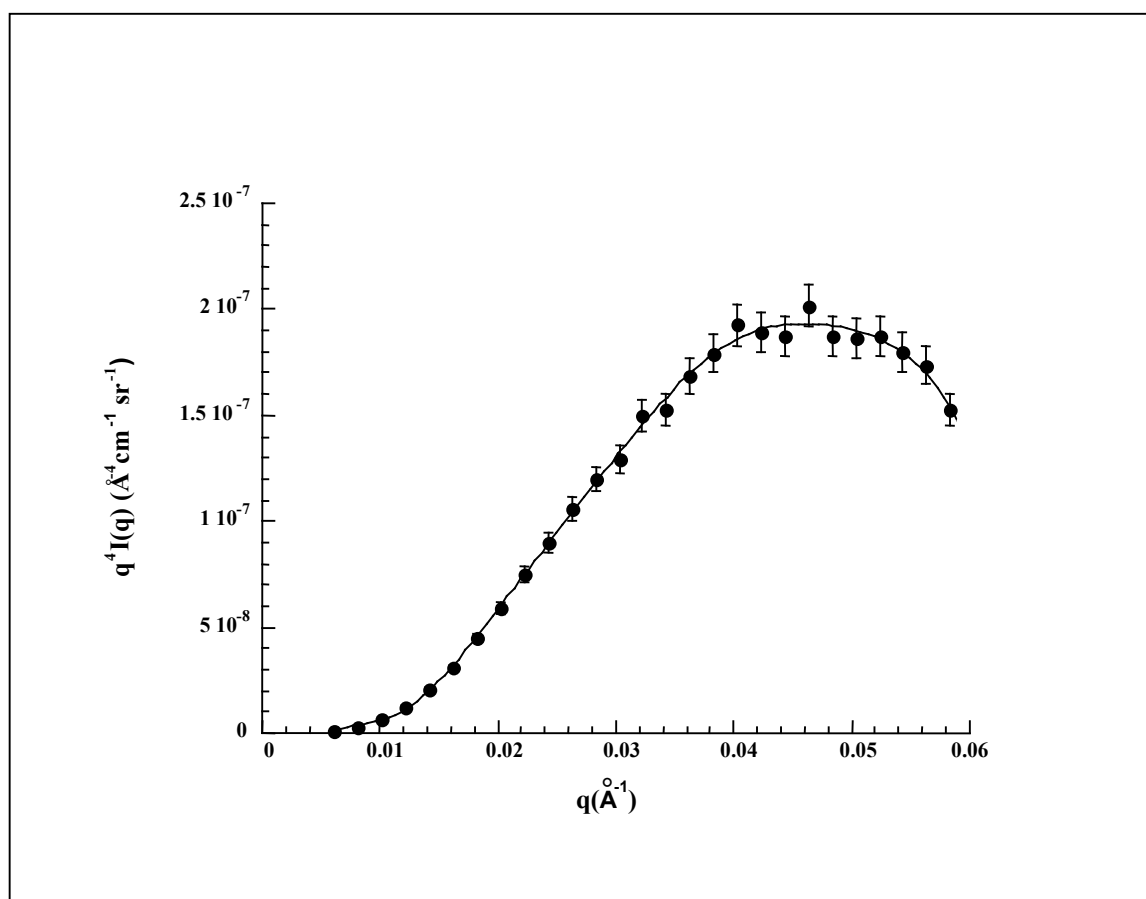


Figure.III-14 : *Exemple de représentation de Porod, pour un échantillon de β -caséine en présence de $[GdmC] = 0,75$ et température fixée à 20°C . Le trait continu est l'ajustement par le modèle présenté par deux sphères concentriques de rayon R_1 (cœur) et R_2 (couronne).*

À partir des ajustements précédents, nous avons obtenu des informations sur le rayon du cœur, R_1 , et le rayon de la couronne, R_2 . Les figure.III-15 (a, b), représentent la variation de ces derniers en fonction de la température et de la concentration du chlorure de guanidinium. Les rayons du cœur et de la couronne croient quand la température augmente. Une diminution du rayon du cœur et de la couronne lorsque la concentration de GdmCI augmente. Ces résultats reflètent des changements du nombre d'agrégation, f .

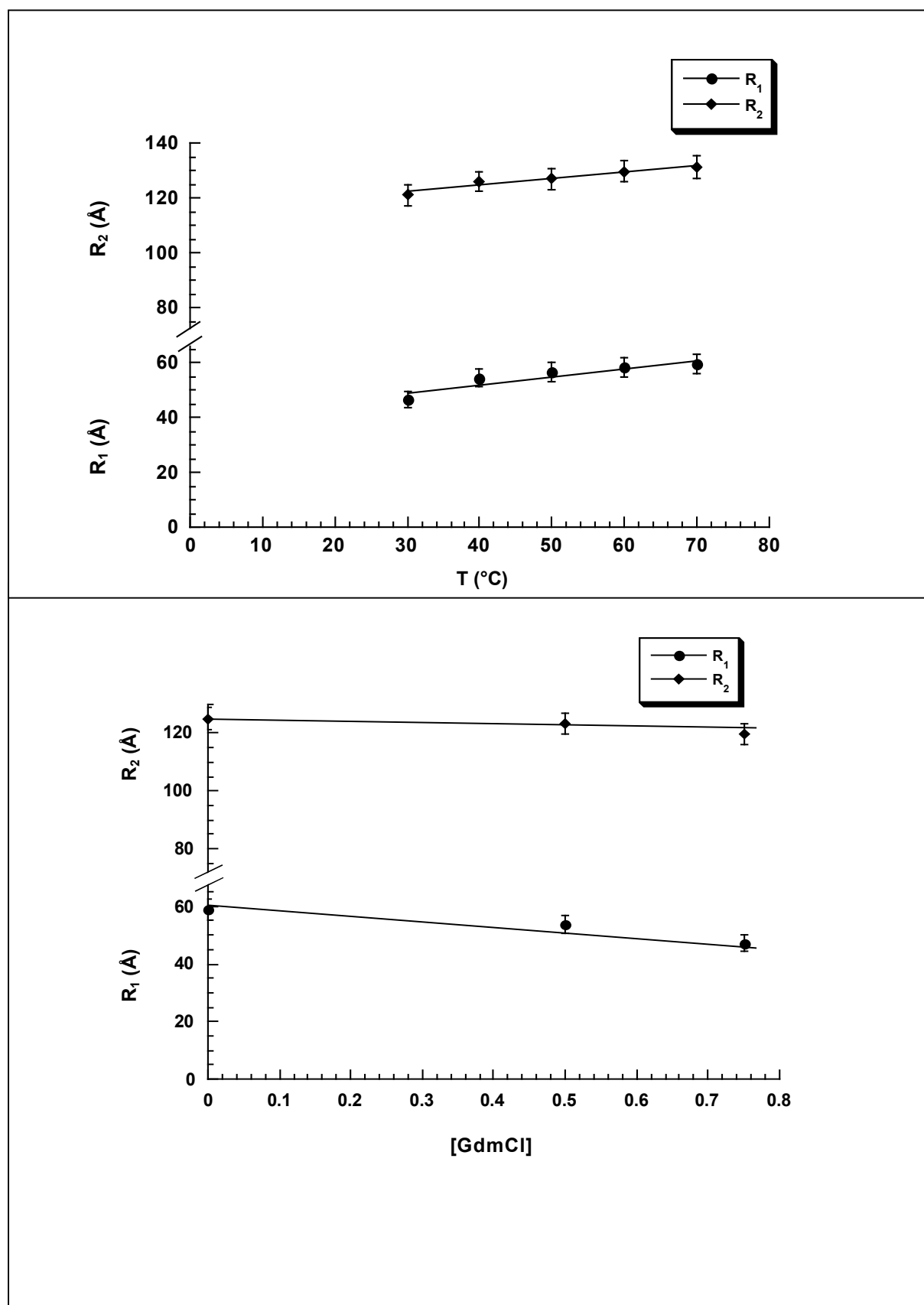


Figure.15. a. b : Variation du rayon du cœur R_1 et de la couronne R_2 en fonction de la température $[GdmCl] = 1$ et de la concentration du GdmCl, $T=20^\circ\text{C}$, respectivement. $c = 7,5 \text{ mg cm}^{-3}$.

Nous rappelons, que lorsque, la température est inférieure ou égale à 20°C et la concentration de GdmCl égale à 1M, la caséine β est un monomère, ($f = 1$) et se comporte comme un homo- polymère. Ainsi, nous ne pouvons pas appliquer le modèle présenté par un cœur dense entouré par une couronne située dans un régime semi-dilué. En fait 1M de GdmCl correspond à la transition entre l'état micellaire de protéine et l'état monomère. L'évolution du rapport entre la taille de la couronne et celle du cœur en fonction de, f , est montrée dans la figure.III-16. Pour les plus petits agrégats, la prépondérance de la taille de la couronne devant celle du cœur ne semble pas suffisamment significative. Donc on ne peut pas négliger la taille du cœur. D'ailleurs la taille relative à la couronne devient plus faible à mesure que le nombre de protéines impliquées par agrégat augmente.

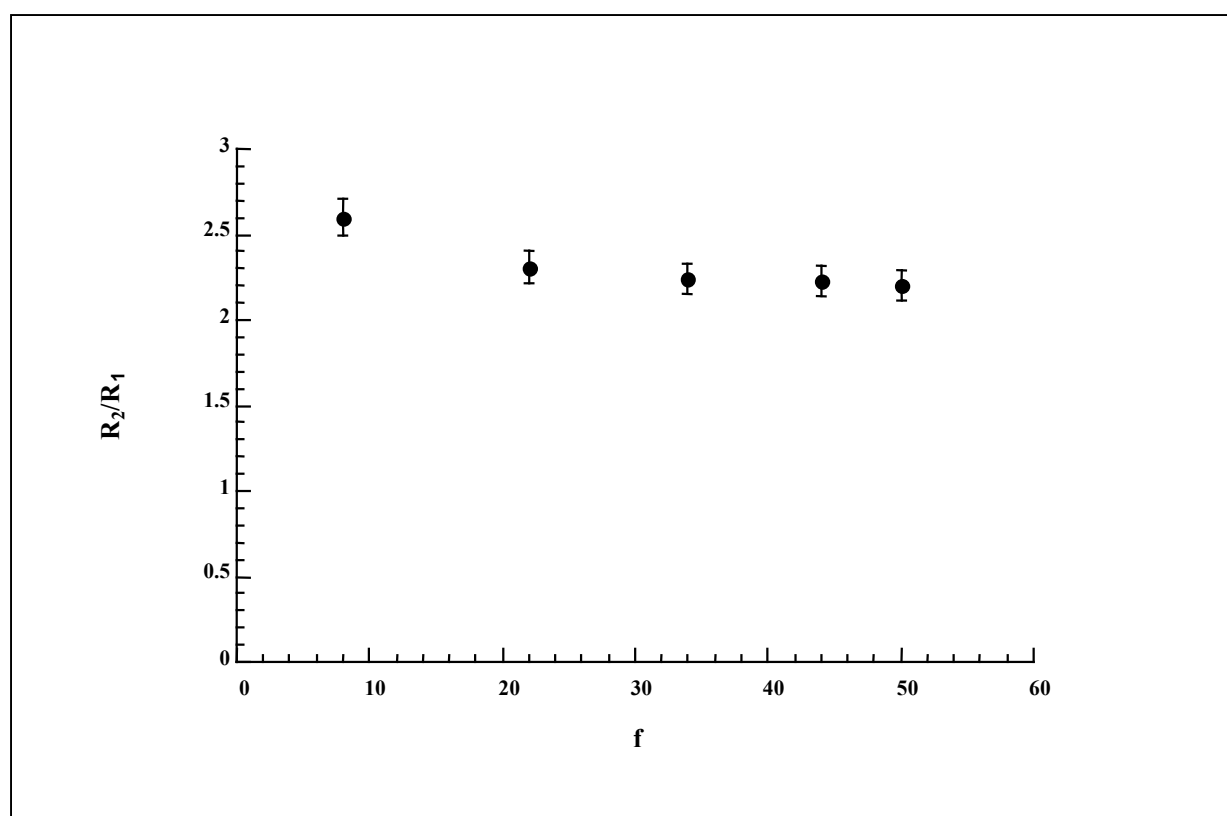


Figure.III-16 : *Variation du rapport du rayon de la couronne sur le rayon du cœur en fonction de, f .*

Dans les Figures.III-17a et III-17b nous montrons, les variations de la proportion relative d'acides aminés dans le cœur de la micelle ϕ_0 en fonction de la température et de la concentration du dénaturant [GdmCl].

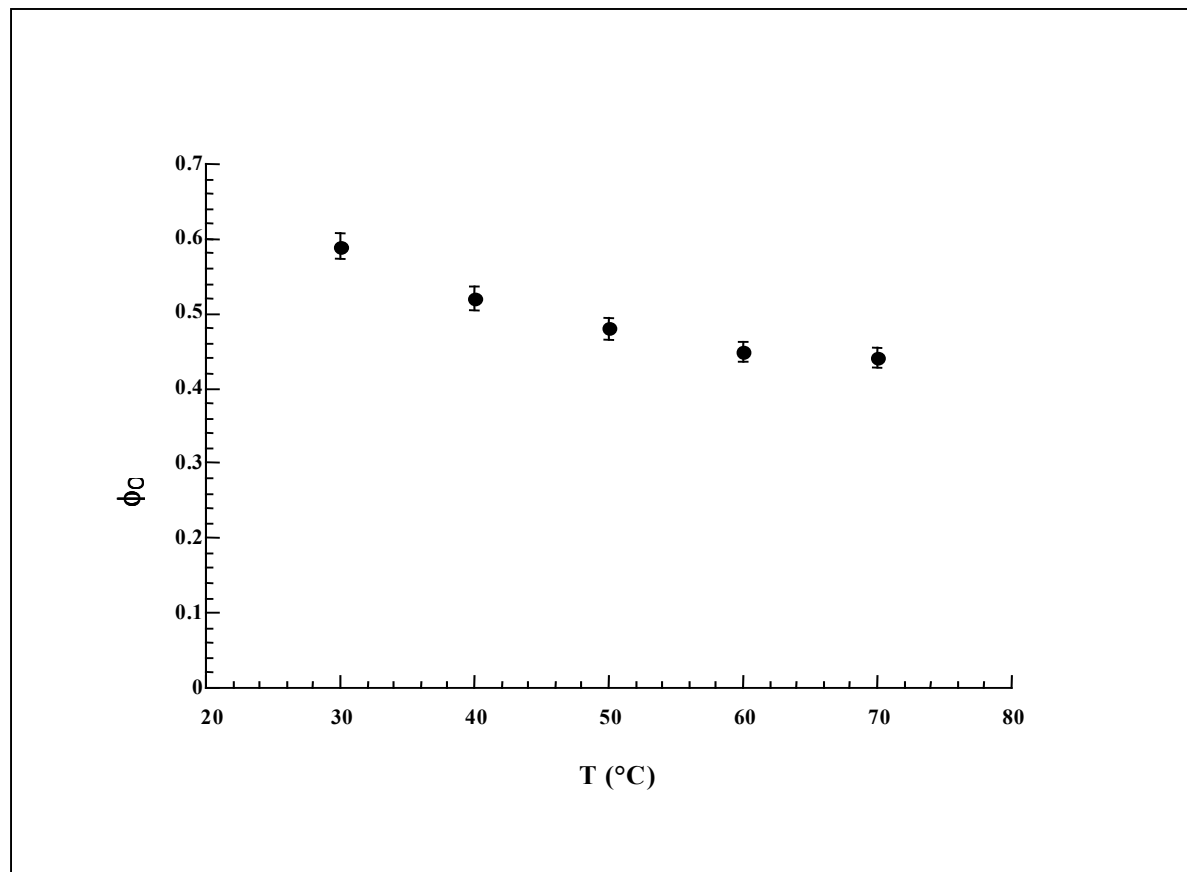


Figure.III-17a: Variation de la proportion relative des acides aminés dans le cœur, ϕ_0 , en fonction de la température, T .

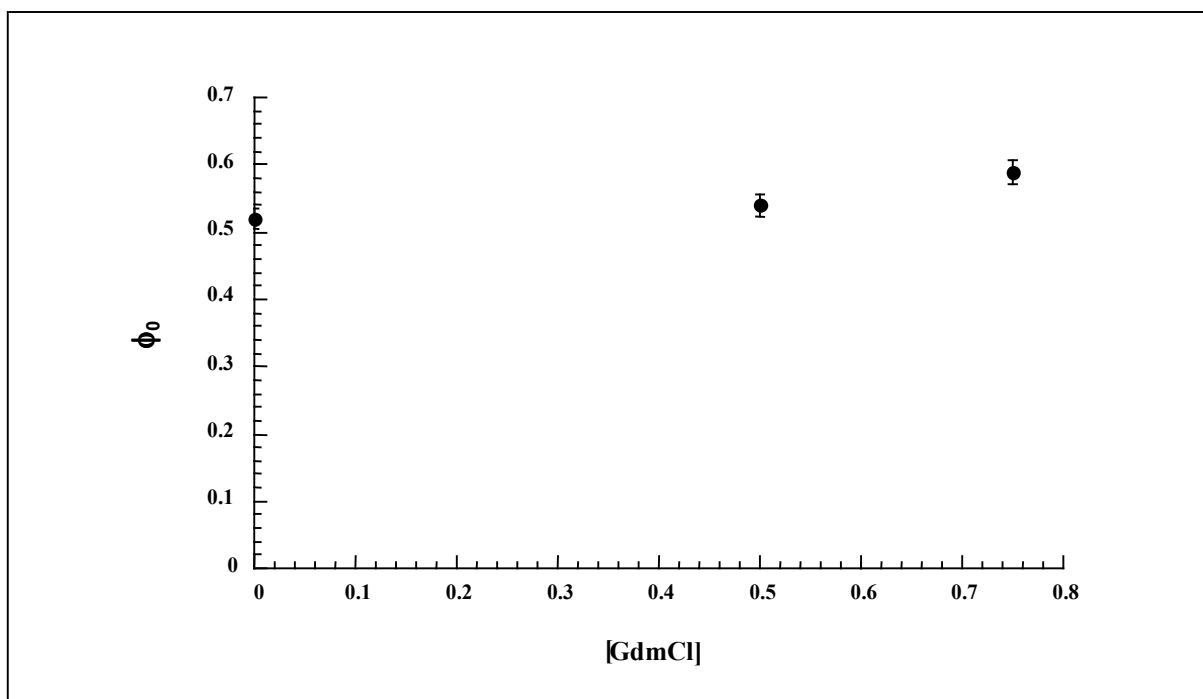


Figure.III-17b : Variation de la proportion relative des acides aminés dans le cœur en fonction de la concentration de GdmCl. $c = 7,5 \text{ mg cm}^{-3}$ et $T = 20^\circ\text{C}$.

Le régime semi-dilué des polymères est défini comme des solutions dans lesquelles la concentration est supérieure à c^* . c^* est désignée habituellement sous le nom d'une concentration critique de recouvrement, c'est-à-dire tout l'espace disponible dans la solution est pris par les protéines. Mathématiquement, elle peut être exprimée comme, $c^* = 3M / 4\pi R^3 N_A$, $4\pi R^3/3$ est le volume occupé par la protéine du rayon R et M / N_A est la masse moléculaire. Pour la caséine β ³¹, $c^* = 80 \text{ mg cm}^{-3}$.

Du facteur de forme donné par la relation (II-56), nous pouvons déterminer la proportion en acide aminé du cœur, c_1 et de la couronne, c_2 , de la micelle. Figure.III-18, montre la variation du rapport de la concentration c_1 du cœur et de la concentration c_2 de la couronne en fonction du nombre f de protéines impliquées par agrégat.

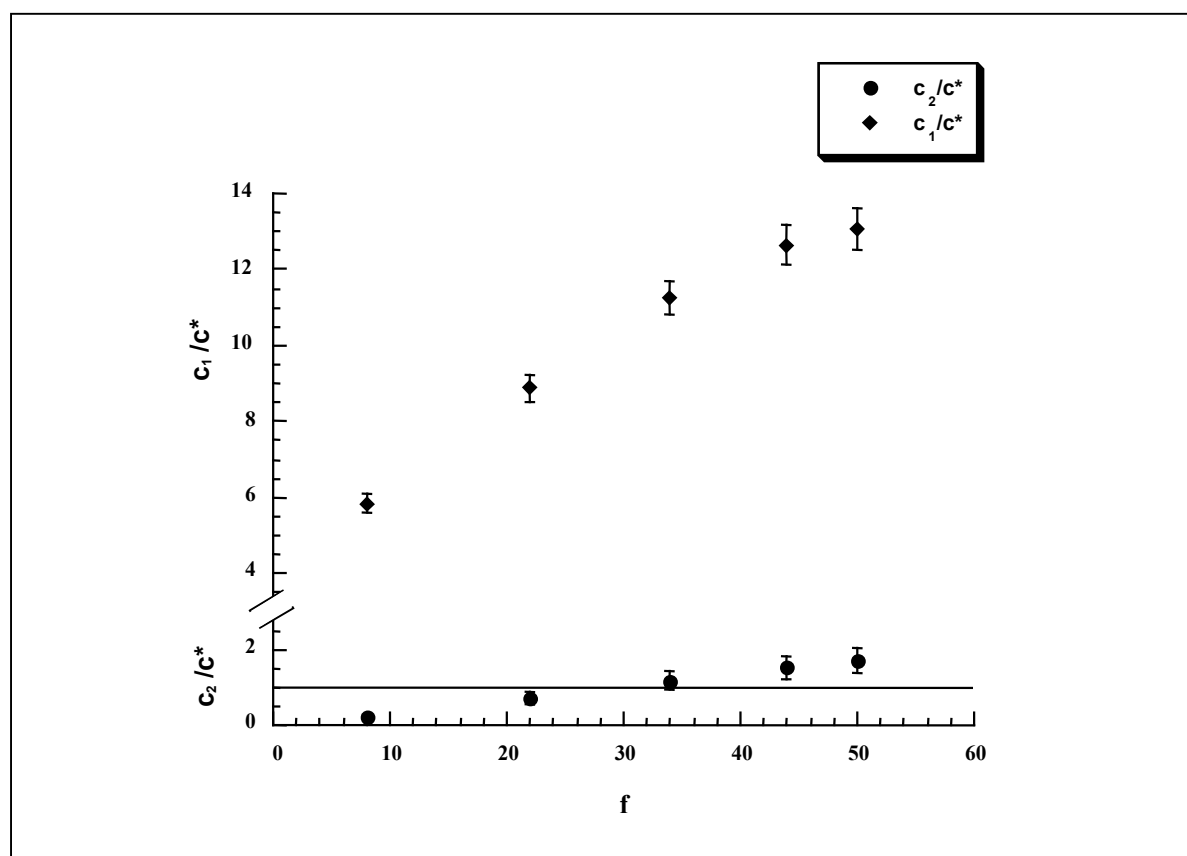


Figure.III-18 : Variation respective du rapport des concentrations des acides aminés dans le cœur et dans la couronne sur c^* en fonction de f . Le trait continu représente $c / c^* = 1$.

La concentration dans le cœur de la micelle est supérieure à c^* et par exemple, pour un nombre $f = 8$ nous trouvons $c_1 = 6 c^*$ et aux grandes valeurs de f nous trouvons $c_1 = 13 c^*$. Le cœur de la micelle de la caséine β est en phase semi-diluée (dense), ($c \gg c^*$). La couronne est dans un régime dilué ($c < c^*$) pour un nombre f inférieur à 30, par contre quand, $f > 30$, la couronne est en régime semi-dilué et par exemple, $f = 50$, $c_2 = 2 c^*$. Le côté externe de la micelle, (couronne) peut être décrit comme un régime de champignon ou de brosse par analogie avec des polymères greffés. Donc la structure des agrégats de caséine entraîne ainsi un comportement très différent de celui correspondant à une structure en "étoile". Mais en présence du sel dans la solution ne nous permet pas de conclure que la température réalise la transition entre l'état solvophile vers un état solvophobe. Par contre des autres études ont montré l'existence de la transition entre ces deux derniers états, mais dans l'eau. En fait un aspect fondamental de nos résultats est la présence d'interactions entre agrégats.³¹

3. STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS DES COUCHES D'ADSORPTION DE CASÉINE- β FORMÉES À L'INTERFACE AIR/LIQUIDE EN MILIEU DÉNATURANT

Nous rappelons que toutes les mesures pour décrire la structure et les propriétés des couches d'adsorption de caséine à l'interface air/liquide ont été effectuées dans un tampon phosphate 0.1M, pH 7 contenant 0.1M de NaCl pour réduire les interactions électrostatiques. Les mesures de réflectivité des neutrons permettent de suivre les changements de profil de concentration selon un axe perpendiculaire à l'interface en fonction de la concentration en GdmCl et en fonction de la température. Les mesures de pression de surface et du module dilatationnel permettent d'évaluer le régime dans lequel se trouve l'interface ainsi que la dimension fractale des blocs de séquences solvophobes de la protéine dans la couche côté air de l'interface, selon le modèle thermodynamique préalablement décrit dans le chapitre II.

3.1. Structure des couches d'adsorption de caséine- β : Mesures de réflectivité

3.1.1. Effet de la concentration en GdmCl

Un premier ensemble de spectres de réflectivité de neutrons est obtenu pour des concentrations en GdmCl comprises entre 0 et 2M, aux températures 10 et 20°C (Tableau.III-4). Les couches d'adsorption sont formées à partir d'une solution homogène de caséine- β à 100 mgL⁻¹. Les spectres expérimentaux (Figure.III-19) montrent une déviation par rapport au spectre de réflectivité d'un dioptre plan parfait (réflectivité de Fresnel). Cette déviation montre l'existence de couche(s) d'adsorption(s) à l'interface. L'ajustement aux spectres d'un modèle à deux couches homogènes en marche d'escalier (paragraphe .2.2.3. du chapitre II) donne systématiquement une valeur de χ^2 plus faible qu'avec un modèle à une couche. Un modèle à 3 couches n'améliore pas significativement l'ajustement. L'épaisseur (Th) et les densités de longueur de diffusion (Nb) de chaque couche extraite des ajustements permettent de calculer la fraction volumique (Φ) (eq II-88) et la concentration de surface (Γ) (II-90) de caséine adsorbée (Tableau III-4). En absence d'agent dénaturant et à la température de 20°C, la concentration de surface totale de caséine β adsorbée est de 2.9 mg m⁻². Cette valeur est très proche de 2.8 mg m⁻², déterminée par réflectivité des neutrons à partir d'une solution de caséine β de 100 mgL⁻¹ de faible force ionique, en ajustant un modèle à 2 couches¹³⁸, et est proche de 2.2 mg m⁻² obtenue par réflectivité des rayons X en ajustant un modèle de loi en puissance²⁹. Cependant, la structure de la couche d'adsorption déterminée dans nos conditions semble être différente

puisque son épaisseur totale est de 13.8 nm au lieu^{.138} de 6.9 nm. Ces différences sont particulièrement importantes dans le cas de la première couche (côté air) avec une épaisseur de 5.2 nm et une fraction volumique de 0.32, au lieu^{.138} de 3.1 nm et 0.52. Les valeurs de la fraction volumique occupée par la protéine indiquent que les blocs de séquence de la protéine présents dans la première couche sont plus gonflés par le solvant que dans le cas étudié précédemment. Ceci doit être lié à la nature du tampon qui comprend 100 mM de phosphate avec 100 mM de chlorure de sodium au lieu de 10 mM d'acide morpholinopropane sulfonique utilisés dans l'étude antérieure. La force ionique est ainsi supérieure à 0.3 dans la présente étude alors qu'elle n'était que de 0.01 dans le cas précédent. La valeur de force ionique de 0.3 réduit efficacement les interactions électrostatiques. Le gonflement de la couche d'adsorption pourrait ainsi s'expliquer par le fait que les attractions ioniques sont bien écrantées par la force ionique.

La concentration de surface totale en caséine β décroît lorsque la concentration en agent dénaturant augmente. Cet effet est directement visible par le fait que les spectres de réflectivité déterminés en présence de GdmCl s'écartent moins de la réflectivité de Fresnel que ceux déterminés avec la protéine seule. Lorsque la concentration en GdmCl augmente de 0 à 1 M, la concentration de surface et l'épaisseur de la première couche proche de l'air diminuent à 10°C, de 1.58 à 0.75 mg/m² et de 49.5 à 26.5 Å et à 20°C de 2.25 à 1.31 mg/m² et de 52.5 à 27.5 Å et restent constantes au-delà de 1M en GdmCl, où la concentration de surface est réduite de 30% quelle que soit la température (Tableau.III-4).

Après la présente partie de cette étude, nous pouvons conclure que le GdmCl modifie les propriétés du solvant. Il a été démontré par ailleurs, à partir de l'étude des propriétés d'agrégation de la protéine en solution (paragraphe 2.1 chapitre. III), qu'à la concentration en GdmCl entre 1 et 1.5 M, la caséine β passe d'un état micellaire vers un état de monomères. En d'autres termes, la chaîne polypeptidique se trouve au-delà de 1.5M en GdmCl dans des « conditions de bon solvant » . Ceci reflète probablement le fait que, pour une protéine dans une micelle l'énergie libre, incluant celles du cœur, de la couronne et de l'interface cœur / couronne, est plus grande que l'énergie de solvation par le solvant.^{.87} Dans d'autres termes, les chaînes hydrophobes n'imposent plus leur comportement sur la structure de la molécule en solution (formation de « clusters » hydrophobes dans la chaîne ou entre les chaînes polypeptidiques). Cette zone de transition au niveau des structures des couches d'adsorption à l'interface air/tampon se traduit en l'occurrence par une diminution de la concentration de

surface totale de caséine β adsorbée et par une première couche plus fine avec une fraction volumique plus grande que celle de la deuxième couche. Cette situation montre clairement que certains blocs de la chaîne polypeptidique ont toujours une affinité pour l'interface et qu'une partie des acides aminés qui les composent possède un excès d'énergie attractive vers l'interface¹³⁹ même en présence de GdmCl.

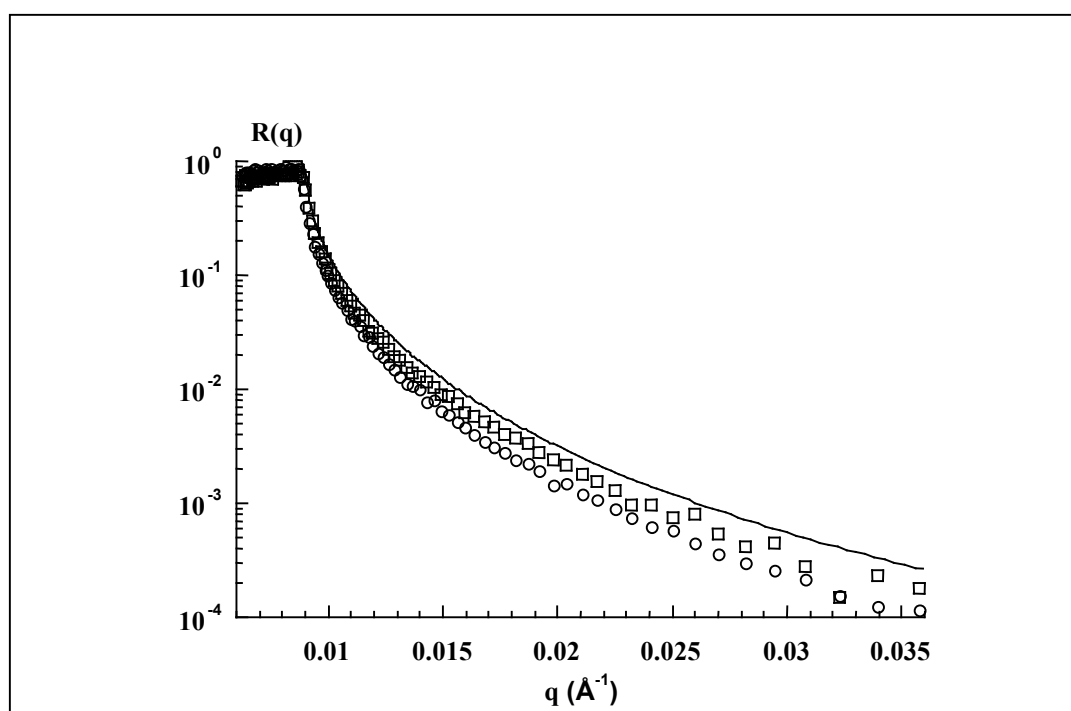


Figure III-19 : *Effet de la concentration en GdmCl sur les spectres de réflectivité $R(q)$. q est le vecteur d'onde, R , la réflectivité. Le trait continu représente le spectre du tampon seul. Les concentrations en GdmCl sont : (○), 0M ; (□), 2M.*

10°C										
GDMCL (mole L ⁻¹)	Nb _s 10 ⁻⁶ (Å ⁻¹) (± 0.05)	Nb ₁ 10 ⁻⁶ (Å ⁻¹) (± 0.05)	Nb ₂ 10 ⁻⁶ (Å ⁻¹) (± 0.05)	d ₁ (Å) (± 0.5)	d ₂ (Å) (± 0.5)	φ ₁ (± 0.01)	φ ₂ (± 0.01)	Γ ₁ (mg m ⁻²)	Γ ₂ (mg m ⁻²)	Γ _t (mg m ⁻²)
0	6.13	5.37	6.00	49.5	115.0	0.24	0.04	1.58± 0.08	0.6± 0.2	2.2± 0.2
0.5	6.32	5.43	6.13	32.5	75.5	0.26	0.06	1.15± 0.06	0.6± 0.1	1.7± 0.2
0.7	6.20	5.15	5.95	30.5	83.0	0.32	0.08	1.32± 0.05	1.0± 0.1	2.3± 0.2
1.0	6.02	5.37	5.81	26.5	69.5	0.21	0.07	0.75± 0.05	0.7± 0.1	1.4± 0.2
1.5	6.33	5.33	6.08	18.5	68.5	0.29	0.07	0.74± 0.05	0.7± 0.1	1.4± 0.2
1.7	6.34	5.20	6.18	17.5	71.5	0.34	0.05	0.79± 0.05	0.5± 0.1	1.2± 0.1
2.0	6.37	5.31	6.19	18.5	65.5	0.31	0.05	0.77± 0.05	0.5± 0.1	1.3± 0.2
20°C										
0	6.23	5.18	6.04	52.5	86.0	0.32	0.06	2.25± 0.09	0.7± 0.1	2.9± 0.2
0.5	6.30	5.23	6.18	44.0	85.5	0.32	0.04	1.89± 0.08	0.4± 0.1	2.3± 0.2
0.7	6.33	5.28	6.06	32.5	72.0	0.31	0.08	1.36± 0.06	0.8± 0.1	2.1± 0.2
1.0	6.34	5.14	6.12	27.5	70.5	0.35	0.07	1.31± 0.06	0.6± 0.1	1.9± 0.2
1.5	6.41	5.23	6.22	24.5	86.5	0.34	0.06	1.12± 0.06	0.6± 0.1	1.8± 0.2
1.7	6.42	4.86	6.30	24.0	103.0	0.45	0.04	1.45± 0.06	0.5± 0.1	1.9± 0.2
2.0	6.43	4.67	6.40	21.0	150.0	0.51	0.01	1.43± 0.06	0.2± 0.2	1.6± 0.2

Tableau. III-4: Effet de la concentration en GdmCl sur la structure des couches d'adsorption formées de caséine β à l'interface air/liquide. Les spectres de réflectivité de neutrons ont été analysés en utilisant le modèle à deux couches décrit dans le paragraphe 2.2.3 du (chapitre II). Nb est la densité de longueur de diffusion, d et Φ, l'épaisseur et la fraction volumique de chaque couche et Γ, la concentration de surface. Les indices s, 1 et 2 renvoient respectivement au substrat, à la couche près de l'air et à la couche qui se situe entre la couche précédente et le substrat. La concentration de surface totale est $\Gamma_t = \Gamma_1 + \Gamma_2$. La concentration volumique de la caséine β est 100 mg L⁻¹. Le substrat choisie est le tampon phosphate 0.1M, pH 7 contenant 0.1M de NaCl.

3.1.2. Effet de la concentration en protéine

Un deuxième ensemble de spectres de réflectivité a été obtenu à partir d'une solution de caséine β à concentration 5.9 mg mL⁻¹, proche de celle utilisée en diffusion des neutrons (paragraphe 3.1 chapitre. III) et supérieure à la concentration micellaire critique qui est de 0.8 mg mL⁻¹ dans l'eau légère à température ambiante^{.140}, de 1 mg mL⁻¹ à 4°C, dans l'eau lourde^{.31} et de 5 mg mL⁻¹ en présence de 1M de GdmCl.^{.91} Cette concentration a été choisie pour comparer précisément les données sur la structure des couches d'adsorption avec celles obtenues sur la structure des micelles de caséine-β en solution. La concentration en GdmCl de 1M a également été choisie du fait qu'elle correspond à une région de transition entre une structure de micelle et celle de monomères.^{.141} Comme dans les expériences précédentes, et d'une manière satisfaisante, les données expérimentales ont été ajustées par un modèle à deux couches (Tableau III-5). Les concentrations de surface sont cependant plus faibles à 10 et 20°C que celles calculées à partir des données expérimentales obtenues avec une solution de caséine

β à 100 mg L⁻¹ (Tableau III-4). Des résultats semblables ont été obtenus par réflectivité des rayons X avec des concentrations de caséine β augmentant de 100 à 1000 mg L⁻¹. La seule interprétation trouvée a été qu'une partie des blocs hydrophobes de la protéine est éjectée de la phase liquide pour former un quasi-fondu du côté air de l'interface. On a supposé alors que l'indice de réfraction de cette couche était celui d'un milieu composé d'air et de protéine sans solvant. Une telle interprétation à 1000 mg L⁻¹ a permis d'obtenir une valeur de la concentration de surface totale plus élevée que celle obtenue avec 100 mg L⁻¹ de protéine ce qui est cohérent et satisfaisant d'un point de vue thermodynamique.²⁹ Dans la gamme de vecteur d'onde étudiée, entre 0.017 et 0.095 Å⁻¹, un modèle à trois couches ne permet pas de diminuer la valeur de la fonction d'erreur χ^2 . Ainsi, pour évaluer le bienfondé de l'hypothèse selon laquelle une partie de la protéine est dans l'air au lieu d'être dans le substrat, nous avons utilisé un modèle comportant une couche dans l'air avec des caractéristiques déterminées précédemment (une épaisseur de 9.5 Å et une fraction volumique, $\Phi = 0.64$)²⁹ en plus des deux couches aux paramètres ajustables. L'ajustement de ce modèle aux résultats expérimentaux donne une valeur de χ^2 pratiquement égale à celle obtenue avec un modèle à deux couches dans le substrat (tableau III-5). Cette procédure ne change pas le χ^2 avec une couche dans l'air de fraction volumique fixée à 0.64 et une épaisseur inférieure à 11.5 Å à 5°C, 9.5 Å à 10°C ou 13.1 Å à 30°C, ou bien avec une couche d'épaisseur fixée à 9.5 Å et une fraction volumique inférieure à 0.64 à 5.5°C, 0.56 à 10°C ou 0.64 à 20 et 30°C. Finalement, il est important de noter que la détermination du profil de concentration par réflectivité des neutrons ou des rayons X peut donner des résultats corrects seulement si le modèle d'ajustement est suffisamment précis. Dans le cas de blocs de copolymères synthétiques adsorbés à l'interface air/liquide, il a été démontré aussi en utilisant des blocs deutérés, qu'il existe une couche dans l'air d'une épaisseur de 20 Å environ.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Cette dernière étude sur des molécules organiques synthétiques conforte l'interprétation que nous donnons dans le cas de la caséine- β .

modèle A DEUX couches										
TEMPERATU RE (°C)	Nb ₁ 10 ⁻⁶ (Å ⁻¹) (± 0.05)	Nb ₂ 10 ⁻⁶ (Å ⁻¹) (± 0.05)	d ₁ (Å) (± 0.5)	d ₂ (Å) (± 0.5)	φ ₁ (± 0.01)	φ ₂ (± 0.01)	Γ ₁ (mg m ⁻²)	Γ ₂ (mg m ⁻²)	Γ _t (mg m ⁻²)	χ ²
5.5	5.78	6.28	40.6	120.9	0.17	0.02	0.93± 0.07	0.3± 0.2	1.3± 0.2	0.2084
10.0	5.79	6.26	44.4	113.3	0.16	0.03	0.96± 0.07	0.5± 0.2	1.4± 0.2	0.0169
20.0	5.74	6.22	50.8	81.6	0.18	0.04	1.23± 0.08	0.4± 0.1	1.7± 0.2	0.1491
30.0	5.39	6.15	51.6	90.7	0.28	0.06	1.95± 0.09	0.7± 0.1	2.7± 0.2	0.0060
modèle A DEUX couches plus une couche dans l'air										
5.5	5.89	6.28	38.7	119.8	0.13	0.02	0.68± 0.06	0.3± 0.2	1.8± 0.3	0.2081
10.0	5.91	6.26	44.6	109.6	0.13	0.03	0.78± 0.07	0.4± 0.2	2.0± 0.3	0.0170
20.0	5.83	6.22	49.7	76.8	0.15	0.04	1.00± 0.08	0.4± 0.1	2.2± 0.3	0.1486
30.0	5.48	6.15	49.6	88.2	0.25	0.06	1.64± 0.08	0.7± 0.1	3.2± 0.3	0.0059

Tableau.III-5. Effet de la température sur la structure des couches d'adsorption formées de caséine β à l'interface air/tampon en présence de GdmCl 1M dans la solution. Les spectres de réflectivité de neutrons ont été analysés en utilisant les modèles à deux et trois couches décrites dans le paragraphe 2.2.3. (chapitre II) . Nb est la densité de longueur de diffusion, d et Φ , l'épaisseur et la fraction volumique de chaque couche et Γ_i la concentration de surface. Les indices s, 1 et 2 renvoient respectivement au substrat, à la couche près de l'air et à la couche qui se situe entre la couche précédente et le substrat. La concentration de surface totale est $\Gamma_t = \Gamma_1 + \Gamma_2$. La concentration volumique de la caséine β est 5900 mg L⁻¹. Le substrat est le tampon phosphate 0.1M, pH 7 contenant 0.1M de NaCl. Dans le cas du modèle à trois couches, une couche dans l'air d'épaisseur 9.5Å ($\Phi=0.64$, $\Gamma=0.82$ mgm⁻²) selon Harzallah et al. (1998) est ajoutée au modèle à deux couches avec des paramètres ajustables.²⁹

3.1.3. Effet de la température

L'abaissement de la température de 30°C à 10°C amène une diminution de la concentration de surface totale de caséine β , et ceci quelle que soit la concentration en GdmCl (Tableaux. III-4 et III-5). En l'absence de GdmCl, la concentration de surface diminue de 2.9 à 2.2 mg m⁻². La fraction volumique de la première couche à 20°C est plus élevée qu'à 10°C. Ce résultat est conforme à l'idée générale que la première couche comporte une grande partie des séquences hydrophobes et que ces dernières tendent à interagir de plus en plus entre elles lorsque la température augmente (figure.III-20).

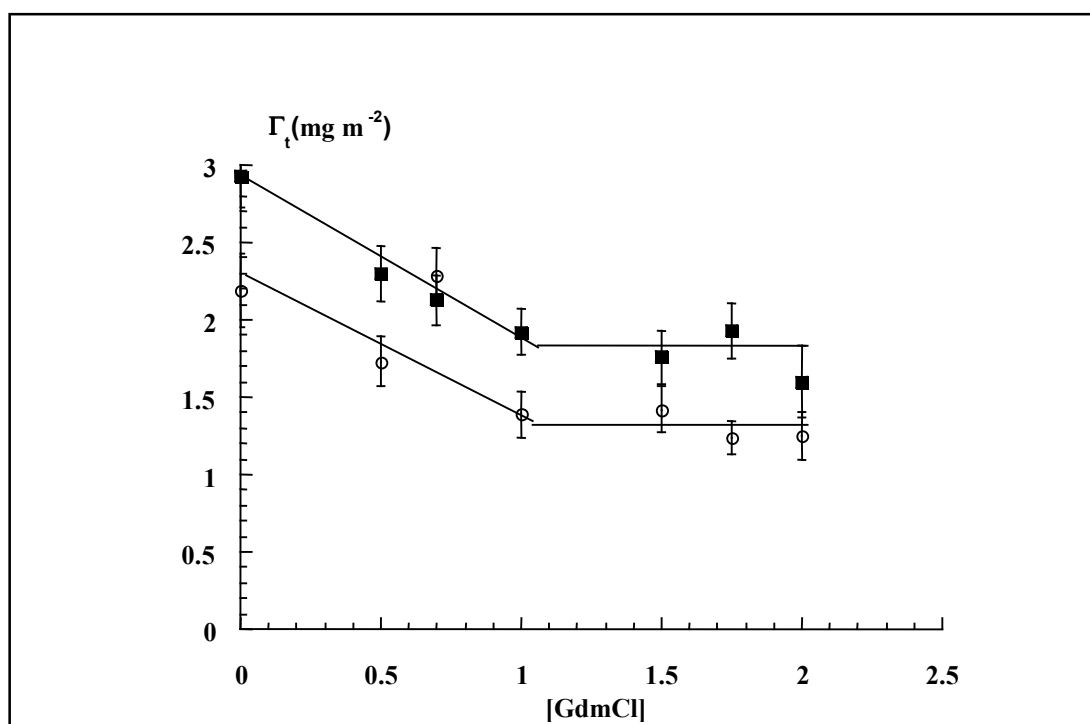


Figure. III-20: Effet de la concentration en GdmCl et de la température sur la concentration de surface totale, Γ_t , de caséine β adsorbée à l'interface air/Tampon : (○), 10°C ; (■) 20°C (données sont dans le tableau V-2)

A la fin de cette première partie, nous pouvons conclure que le GdmCl modifie les propriétés du solvant. Comme il a été montré dans le paragraphe 3.2 du chapitre. III, la caséine β passe d'un état micellaire vers un état de monomères pour une concentration en GdmCl comprise entre 1 et 1.5M. La chaîne se trouve alors dans les conditions dites de « bon solvant ». Cette transition est aussi observée par un changement du profil de concentration des couches d'adsorption à la même concentration en GdmCl. Ce changement de profil de concentration devrait s'accompagner d'une modification des propriétés de surface. Celles-ci sont analysées dans le paragraphe ci-dessous.

3.2. Propriétés des couches d'adsorption de caséine- β

3.2.1. Propriétés dynamiques des couches d'adsorption

Comme il a été précédemment montré^{87,138}, les mesures du module dilatationnel, ε , en fonction de la pression de surface, π , peuvent apporter des informations sur les régimes et la structure des molécules de protéine à l'interface. Le paramètre qui nous permet d'avoir ces informations est l'exposant, y , de la loi d'échelle reliant la pression de surface à la concentration

de surface (eq. I-42). C'est aussi la pente « y » de la droite joignant l'origine et n'importe quel point des courbes ε/π (Figure III-21). Le module dilatationnel a été mesuré pendant la formation de la couche d'adsorption. L'interface est alors dès sa création soumise à une déformation sinusoïdale qui permet de calculer $|\varepsilon|$ en fonction de π (eq. I-48). L'amplitude de l'oscillation, ΔA est choisie pour que la valeur du module dilatationnel soit indépendante de ΔA . Expérimentalement, $\Delta A/A$ n'excède pas 0.2.¹⁴⁵ La fréquence choisie est de 0.1 Hz, soit la plus élevée possible de manière à ce que l'interface change le moins possible durant la déformation. Ces mesures en mode dynamique ont été réalisées en fonction de la température et de la concentration en GdmCl.

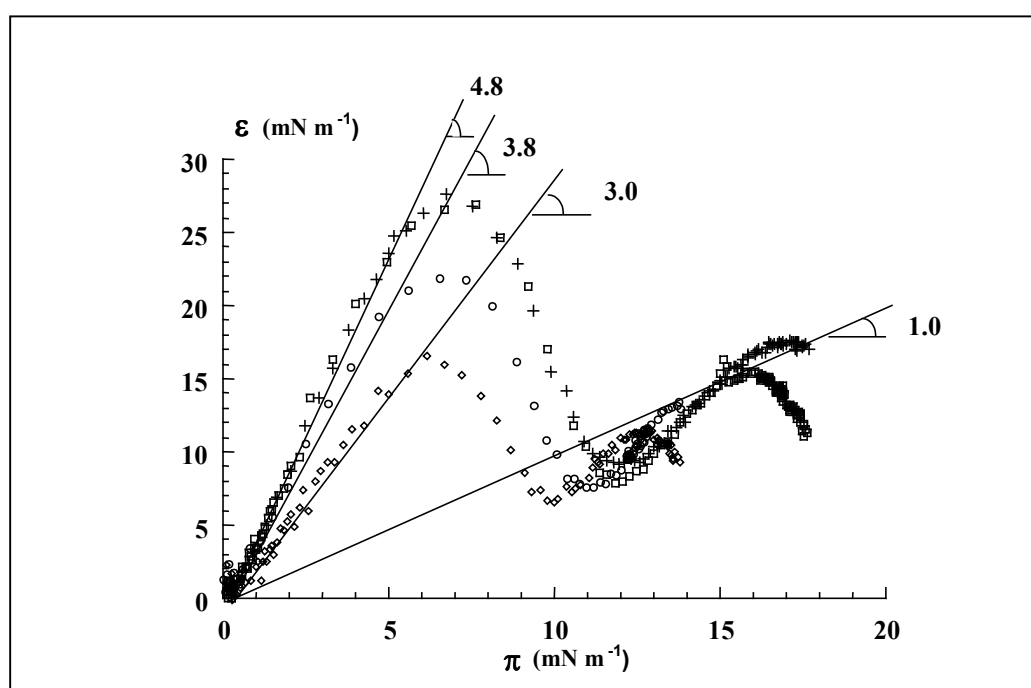


Figure.
III-21 :
Effet
de la

concentration en GdmCl sur la relation entre le module dilatationnel, ε , et la pression de surface, π . Le module dilatationnel et la pression de surface ont été enregistrés simultanément pendant l'adsorption de la caséine β en solution à 100 mgL^{-1} . La température est 10°C . La concentration en GdmCl est : (+), 0M ; (□), 1M ; (○), 2M ; (◇), 4M. .

3.2.1.1. Effet de la température

L'effet de la température sur les courbes ε/π mesurées en absence de GdmCl n'est pas très prononcé dans l'intervalle de pression de surface étudié (Figure III-22). Cependant, il est clair que la droite reliant chaque point à l'origine a une pente constante jusqu'à une pression de surface de $5\text{-}6 \text{ mN m}^{-1}$, et que cette pente diminue lorsque la température augmente. Dans le modèle de polymères, cette variation de la pente, indique que la structure de la protéine à

l'interface correspond à une galette à deux dimensions dont la dimension fractale diminue lorsque la température augmente.⁸⁷ La diminution de la pente indique que les interactions entre les monomères sont rompues quand la température augmente. Ces interactions mises ainsi à contribution sont donc de type liaisons hydrogènes plutôt que de type interactions hydrophobes, qui en général tendent au contraire à augmenter lorsque la température augmente. Les autres caractéristiques de ces courbes sont semblables à celles des courbes de la Figure. III-21 et sont discutées dans le prochain paragraphe.

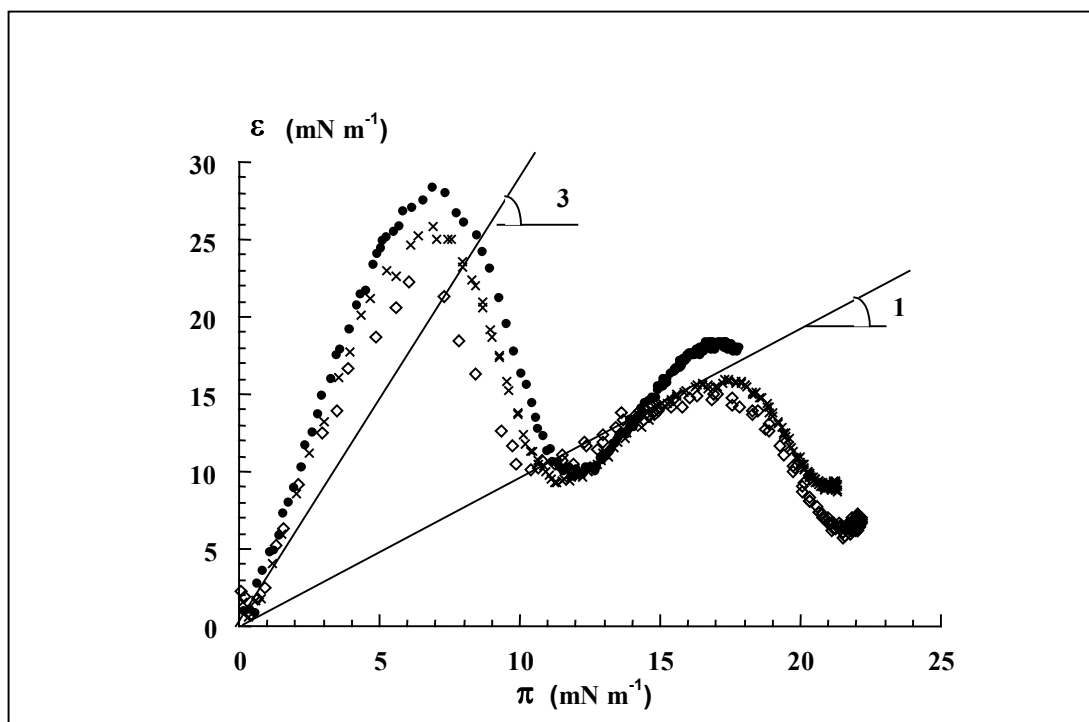


Figure.III-22: Effet de la température sur la relation entre le module dilatationnel, ε , et la pression de surface, π . Le module dilatationnel et la pression de surface ont été enregistrés simultanément pendant l'adsorption de la caséine β en solution à 100 mgL^{-1} en absence de GuHCl . La température est de : (\bullet), 10°C ; (\times), 20°C ; (\diamond), 30°C .

3.2.1.2. Effet de la concentration en GdmCl

L'effet de la concentration en GdmCl sur les propriétés de surface est reporté dans la figure.III-21. Les principales caractéristiques de ces courbes peuvent être décrites en fonction de la pression de surface (l'axe des abscisses) et interprétées selon les théories rappelées dans le chapitre-II. On observe d'abord une relation linéaire entre le module et la pression jusqu'à $5\text{--}6 \text{ mNm}^{-1}$. Ceci indique que ces deux grandeurs sont reliées par une loi en puissance qui correspond selon la théorie au premier régime semi-dilué.⁸⁷ Le régime gazeux n'est pas visible

sur la figure puisqu'il se termine autour d'une pression de surface de l'ordre de 1 mNm^{-1} . La pente « y » de la ligne entre 0 et $5\text{-}6 \text{ mNm}^{-1}$ est supérieure à 3. Cette valeur correspond au cas où les propriétés de surface de l'interface seraient dominées par un comportement bidimensionnel. Puis, cette pente diminue progressivement jusqu'à une valeur de 3 pour une concentration en GdmCl entre 2M et 4M (Figures III-21 et III-23). Les valeurs de « y » sont reliées à l'exposant de Flory et indiquent que les molécules à l'interface se trouvent sous une conformation de type « galettes » entre les conditions θ ($y = 8$) et les conditions de « chaîne à volume exclu » ($y=3$). Ainsi, les résultats montrent qu'aux concentrations en GdmCl plus grandes que 2 M, l'énergie attractive entre les unités statistiques des blocs solvophobes à deux dimensions est faible alors qu'elle est plus grande aux concentrations en GdmCl inférieures à 2M (Figures III-21 et III-23). D'ailleurs, l'effet de la température sur la valeur de « y » indique aussi que les interactions sont plus fortes à 10°C qu'à 20°C et encore plus qu'à 30°C . Ainsi, ces interactions ne semblent pas être de type hydrophobe. On peut réellement suspecter la présence de liaisons de type hydrogène dans le squelette de la chaîne polypeptidique, analogues à celles des hélices α et feuillets β bien connus dans les protéines. La présence de liaisons hydrogènes nombreuses dans les couches d'adsorption de peptides et de protéines semble d'ailleurs avoir été déjà caractérisée.^{.146,147}

Aux pressions de surface comprises entre 6 et $10\text{-}12 \text{ mN m}^{-1}$, un « crossover » est observé, qui n'a pas la forme prévue par le modèle théorique. Ceci montre bien la différence que l'on a entre un modèle théorique dans lequel les transitions entre les régimes sont abruptes et l'expérience qui est réalisée avec un polymère réel de petite taille où ces changements de régime s'opèrent " en douceur " ce qui provoque un " lissage " des courbes expérimentales par rapport aux modèles. Toutefois, le « crossover » semble commencer toujours à la même pression de surface ($5\text{-}6 \text{ mNm}^{-1}$) et donc à la même longueur de corrélation entre les objets adsorbés à l'interface quelle que soient la concentration en GdmCl et le type de gonflement des blocs à 2-D dans le régime semi-dilué. Ce « crossover » correspond à la fin du premier régime semi-dilué à 2-D où l'espace à deux dimensions de l'interface est saturée par les unités statistiques. Cette saturation dépend seulement de l'énergie gagnée par chaque monomère et dont la pression de surface donne une évaluation et non de la conformation initiale des blocs qui est déterminée par la concentration en GdmCl. Ceci est exactement observé expérimentalement où les pentes « y » varient en fonction de la concentration en GdmCl avec un « crossover » identique aux environs de $5\text{-}6 \text{ mNm}^{-1}$ (Figure.III-21).

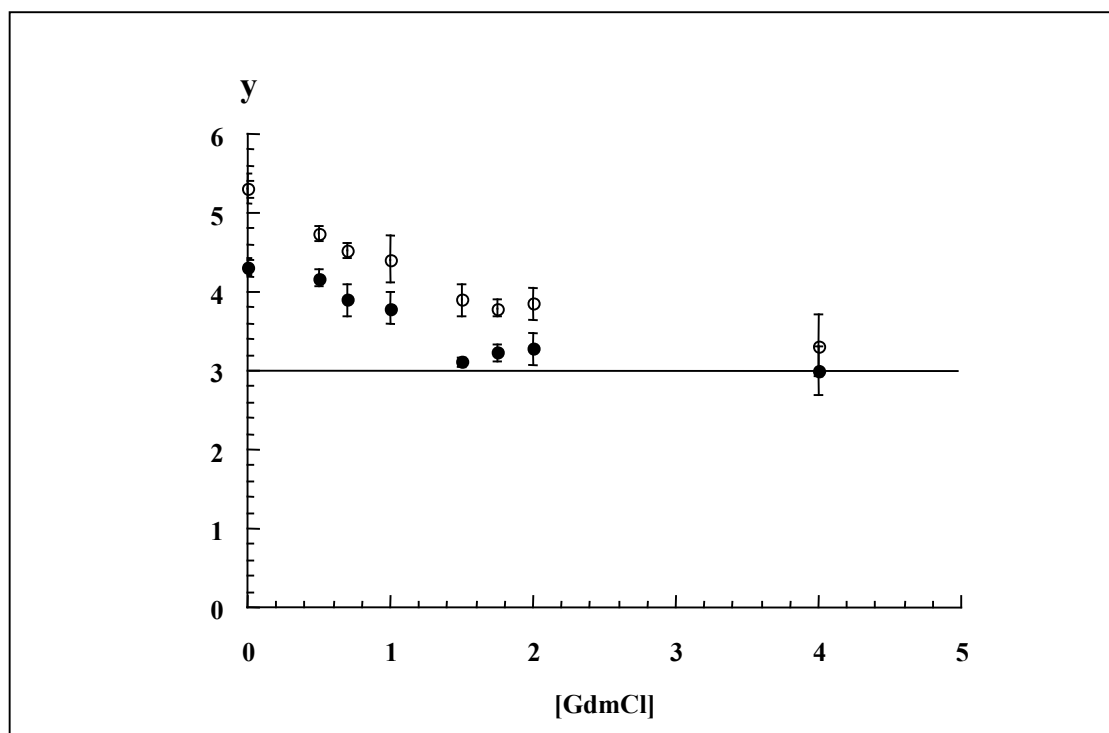


Figure.III-23 : Effets de la concentration en GdmCl et de la température sur l'exposant « y » du premier régime semi-dilué d'une couche d'adsorption de caséine β . L'exposant a été mesuré comme il est montré sur la figure.III-21 et III-22. La concentration volumique est 100 mgL^{-1} . Les températures sont : (○), 10°C ; (●), 30°C .

A une pression de surface proche de 11 mNm^{-1} , la valeur de rapport ε/π est approximativement égale à 0.6, une valeur sensiblement plus petite que 1. La valeur la plus faible attendue si le polymère est caractérisé par une valeur intermédiaire de α : mode II. Ainsi, la faible valeur de « y » signifierait que la protéine a une valeur de α élevée, la situant dans le mode III du diagramme de phase. Dans un tel cas, la valeur théorique de « y » devrait atteindre 0. La différence entre 0 et 0.6 peut être due à un effet de lissage du polymère réel par rapport au modèle asymptotique où les variations de ε se produisent à π constant. Néanmoins, il est facile d'observer qu'après le passage de ce minimum, le rapport ε/π tend vers 1, comme l'indique le modèle. Ensuite, la valeur ε/π décroît, tandis que le modèle prévoit une valeur de « y » constante et égale à 1, (valeur correspondant à une structure de quasi-fondu du côté air et une structure de quasi-brosses côté liquide).

Cette différence montre bien certaine limite du modèle utilisé, fondé sur l'hypothèse que les jonctions entre les séquences hydrophobes et les séquences hydrophiles de la chaîne polypeptidique restent strictement dans le plan de l'interface.

3.2.1.3. Propriétés d'équilibre

La pression de surface a été mesurée en fonction de la concentration en GdmCl dans les conditions de quasi-équilibre après 15 heures d'adsorption de la protéine à 30°C. La concentration de la protéine en solution est de 100 mg L⁻¹. Ainsi, nous avons observé qu'à l'équilibre, la pression de surface est de 24.5 mNm⁻¹ en absence de GdmCl. Celle-ci décroît lorsque la concentration en GdmCl augmente de 0 à 1.5M, puis reste constante à 19.5 mNm⁻¹ au-delà de 1.5M de GdmCl (Figure III-24). Une interprétation de cette observation est que la longueur de corrélation entre les objets non corrélés à l'interface augmente lorsque la concentration en GdmCl augmente. Puisque la pression de surface est proportionnelle à la puissance (-2) de la longueur de corrélation (eq. I-37), il est alors facile de calculer le rapport entre les longueurs de corrélation obtenues en absence de GdmCl et en présence de GdmCl : $(24.5/19.5)^{1/2} = 1.12$. Ce rapport peut correspondre à la variation de la fraction volumique de la protéine dans la couche de « quasi-brosse » du côté liquide, qui devrait imposer son comportement à la couche d'adsorption dans cette situation d'équilibre. En regardant le tableau V-2, une telle corrélation n'apparaît pas dans les fractions volumiques de la deuxième couche où on s'attendait à trouver les structures en quasi-brosses. Les faibles valeurs de fraction volumique et les inexactitudes expérimentales en sont vraisemblablement la cause. Cependant, l'augmentation de la longueur de corrélation est en accord avec le gonflement des structures des molécules adsorbées précédemment remarqué par la diminution de la valeur de l'exposant « y » lorsque la concentration en GdmCl augmente (Figure III-23).

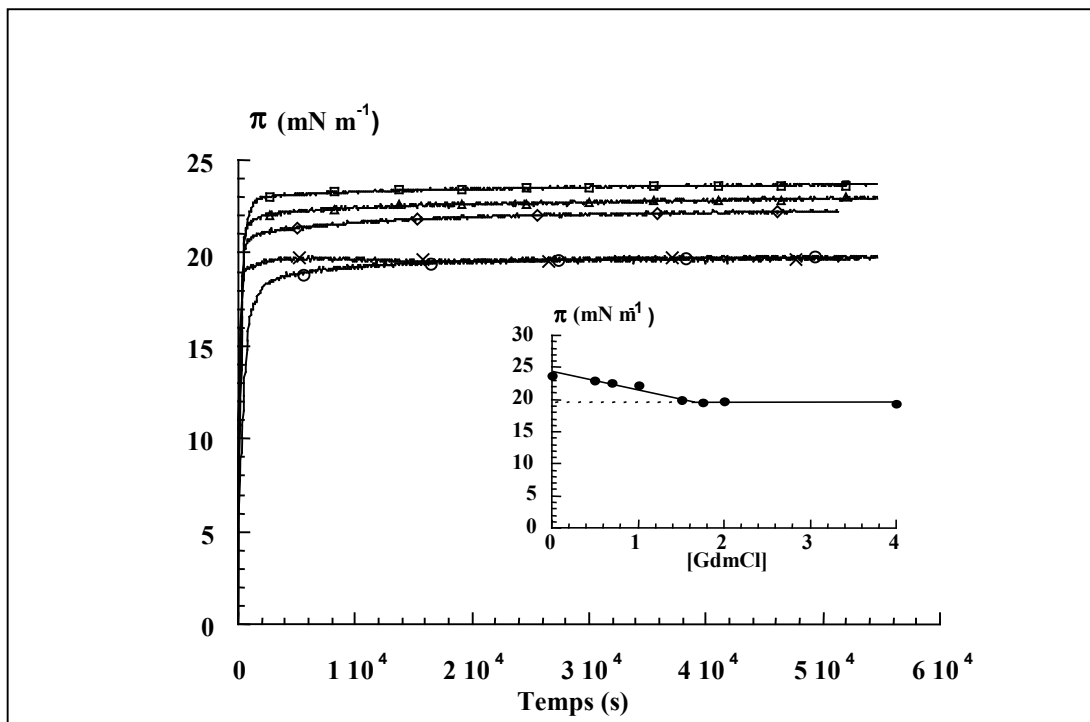


Figure III-24 : Cinétiques d'adsorption de la caséine β en fonction de la concentration en GdmCl. π est la pression de surface (mNm⁻¹). La concentration volumique de la protéine est 100 mgL⁻¹. La température est fixée à 30°C. Les concentrations en GdmCl sont : (□), 0M ; (Δ), 0.5M, (◇), 1M ; (×), 1.5M, (○), 2M.. La figure insérée dans le cadre montre les valeurs de quasi-équilibre de π , obtenues au bout de 15 heures de cinétique d'adsorption, en fonction de la concentration en GdmCl.

Conclusion

Dans un solvant aqueux, la caséine β est composée des monomères hydrophiles et hydrophobes et forme des structures micellaires sphériques, dont à partir nous pourrions extraire les caractéristiques principales, exemples la taille et les interactions entre agrégats.

Les expériences précédentes ont montré qu'en présence dans la solution d'un agent dénaturant, comme le chlorure de guanidinium (GdmCl), la caséine β passe d'un état micellaire vers un état de monomère. En présence de 3 et 4M de GdmCl, nous avons remarqué une légère différence entre les valeurs de $c/I(0,c)$ cela traduit par le fait que les solutions de caséine β ne présentent pas le même contraste. Donc lorsque la concentration du GdmCl augmente le contraste augmente et vice versa.

La mesure du second coefficient du viriel nous a permis d'estimer les interactions intermoléculaires lorsque la protéine est dénaturée par une forte concentration de GdmCl. A fortes concentrations de GdmCl les interactions sont répulsives et que les effets de concentrations ne peuvent pas être négligés. Or nous avons remarqué encore que le second coefficients de viriel est très faible et la valeur obtenue ne prouve pas l'aspect d'un état d'une protéine dépliée, mais peut être c'est un état intermédiaire entre un régime où la caséine β est considérée comme une chaîne gaussienne et un autre régime où elle est considérée comme une chaîne à volume exclu.

La détermination du préfacteur P_∞ et de l'exposant ν permet encore de connaître la nature des interactions. Les valeurs obtenues montrent que la caséine β en présence de 3M de chlorure de guanidinium se comporte comme un polymère à volume exclu. Donc à partir de ce résultat on peut confirmer l'existence des répulsions à longue distance à l'intérieure de la chaîne polypeptide, interdisent le contact entre les segments d'acides aminés. Nous avons remarqué une contradiction en comparant ce dernier résultat à celui obtenu par l'étude de A_2 . En fait dans la seconde étude la gamme des q , ($3 \leq qR_g \leq 2 R_g/b$) est faible et on ne peut pas confirmer l'état de la protéine si elle est considérée comme une chaîne gaussienne ou à volume exclu.

La détermination de L et b met en évidence l'existence de structures résiduelles le long de la chaîne dénaturée. Mais le problème qui se pose, c'est que le modèle de Pedersen et. al n'est pas bien applicable pour la faible zone de q ($qb < 3.1$). L'effet de concentrations joue un rôle très important. La caséine β en présence d'une forte concentration de chlorure de guanidinium a un rayon de giration gaussien presque égale au rayon de giration à concentration nulle. Ce résultat prouve que la protéine n'est pas dans état totalement déplié et confirme nos résultats obtenus par l'étude du second coefficient de viriel. 4M de chlorure de guanidinium ne change pas la qualité du solvant. Mais, désormais augmente de façon significative la CMC.

Toujours, cette étude prouve que la physique des polymères et l'étude des protéines sont deux aspects complémentaires. Nous avons vu par une approche plutôt simple, une description de la structure des agrégats d'une protéine spécifique. Le modèle de copolymère a pu décrire la caséine β . Les études expérimentales de la caséine β , proche d'une interface air / liquide, qui seront présentées plus loin, indiquent également des similitudes avec l'approche théorique.^{.87}

L'effet du GdmCl sur l'adsorption de la caséine β a été étudié par des mesures de la structure et des propriétés de surface des couches formées à l'interface air/tampon. Les mesures de réflectivité des neutrons ont montré que la quantité de protéine adsorbée diminue quand la concentration en GdmCl augmente. Ceci était prévisible du fait que le GdmCl est un agent qui dénature et augmente la solubilité des protéines. Une élévation de la température augmente la concentration de surface totale de la protéine. L'effet hydrophobe semble donc impliqué dans l'énergie d'adsorption. Aux concentrations volumiques élevées de la solution protéique, l'interprétation des résultats laisse à penser qu'une partie de la protéine adsorbée se trouve dans l'air. Ce phénomène a déjà été observé à partir de résultats obtenus par réflectivité des rayons X dans le cas de la caséine β et par réflectivité des neutrons dans le cas de copolymères multiblocs synthétiques. Il semble donc que l'existence d'une partie de la molécule dans l'air devrait être prise en considération dans tout modèle d'adsorption de copolymères multiblocs à l'interface gaz/liquide.

Les propriétés de surface des couches d'adsorption de caséine β ont été interprétées à partir du modèle thermodynamique d'un polymère multibloc asymétrique.^{.87} Ainsi, l'effet de la concentration en GdmCl est de changer la conformation des blocs bidimensionnels à partir

d'une structure à deux dimensions modérément écroulée vers une structure de chaîne 2 D à volume exclu. Ce changement de structure correspond à la rupture de liaisons non covalentes entre les monomères des blocs bidimensionnels, comme on peut l'attendre des propriétés du GdmCl. Une augmentation de la température semble rompre également des liaisons non covalentes et mène à un gonflement des molécules adsorbées. Ainsi, la conformation des molécules adsorbées dépend fortement d'interactions non covalentes qui ne semblent pas uniquement de nature hydrophobe. Finalement, on peut conclure que de nombreuses liaisons non covalentes contribuent à la structure des blocs solvophobes de la caséine- β lorsque cette protéine est adsorbée à l'interface tampon/air à partir d'un milieu non dénaturant. La présence d'une concentration suffisante de dénaturant semble rompre ces interactions et induire des comportements de polymère à volume exclu.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Dans le but de caractériser plus précisément les états dénaturés d'une protéine, et de comprendre quels sont les facteurs déterminant leur stabilité, nous avons évalué l'effet de la conformation de la caséine β modifiée par le chlorure de guanidinium et plus particulièrement des segments adsorbés sur ses propriétés de surface. Pour cela, nous avons eu recours majoritaires aux techniques de diffusion de neutrons, réflectivité de neutrons et de tensiométrie. Leur utilisation a ainsi permis d'apporter des informations sur ces états dénaturés qui n'auraient pas pu être obtenues par des techniques biophysiques plus classiques.

La caséine β est composée des monomères hydrophiles et hydrophobes et forme des structures micellaires sphériques. Les expériences présentées dans le chapitre III ont montré qu'en présence dans la solution d'un agent dénaturant, comme le chlorure de guanidinium (GdmCl), la caséine β passe d'un état micellaire vers un état de monomère. La concentration micellaire critique (CMC) augmente de façon significative lorsque la concentration de dénaturant augmente.

Une description détaillée de la conformation de la caséine β dénaturée par du chlorure de guanidinium en forte concentration a permis de montrer que la protéine pouvait être dépliée complètement. Dans ces conditions de dénaturation, la chaîne polypeptidique est très étendue, et plus aucune interaction ne semble persister, hormis des interactions de type volume exclu : les chaînes latérales sont complètement solvatées, et peuvent adopter toutes les conformations accessibles autorisées par les rotations autour des liaisons covalentes, tant que des éléments de la chaîne n'entrent pas en contact les uns avec les autres.

La présence d'interaction entre les molécules, qui a été mise en évidence, montre que ces dernières deviennent répulsives et que les effets de concentrations ne peuvent pas être négligés. Par contre le second coefficients de viriel, à 4M de chlorure de guanidinium, est très faible et la valeur obtenue ne prouve pas l'aspect d'un état d'une protéine dépliée ou à volume exclu. En outre, la détermination des paramètres universels P_{∞} et v montre que la protéine en présence de 3M de chlorure de guanidinium se comporte comme un polymère à volume exclu. Cette description que nous donnons n'est malheureusement pas complète, et de nombreuses questions restent en suspens.

Nous avons mesuré les spectres de diffusion de solutions de la caséine β pour des valeurs du module du vecteur de diffusion comprises entre 0.005 et 0.5 \AA^{-1} . Un tel domaine est indispensable pour caractériser correctement une protéine fortement dépliée et les micelles qu'elle forme. Nous avons pu obtenir les valeurs des longueurs de contour et de persistance de la chaîne polypeptidique. Ces derniers sont la cause majeure de la structure native de la caséine β .

Cette étude prouve que la physique des polymères et l'étude des protéines sont deux aspects complémentaires. Nous avons vu par une approche plutôt simple, une description de la structure des agrégats d'une protéine spécifique. Le modèle thermodynamique d'un polymère multibloc asymétrique a pu décrire la caséine β . Les études expérimentales de la caséine β , proche d'une interface air / liquide, indiquent également des similitudes avec l'approche théorique.

L'étude de la dissociation des micelles, a permis de définir des milieux où la protéine est en bon ou assez bon solvant. Dans ces conditions de milieu, on a pu déterminer la structure de la couche d'adsorption formée à l'interface avec l'air, en particulier l'épaisseur et la fraction volumique en protéine. La comparaison de ces paramètres des couches d'adsorption formées en présence et en absence de dénaturant a reflété la variation de qualité de solvant. L'interprétation des résultats obtenus par réflectivité des neutrons et dans le cas des concentrations volumiques élevées de la solution protéique s'appuie sur la connaissance de la structure de l'interface du milieu dénaturant dépourvu de protéine. Encore, ces interprétations des résultats laissent à penser qu'une partie de la protéine adsorbée se trouve dans l'air. Cette partie de la molécule dans l'air devrait être prise en considération dans tout le modèle d'adsorption de copolymères multiblocs à l'interface gaz/liquide.

Le changement des qualités de solvant et de comportement d'agrégation, sont aussi manifestés dans les propriétés thermodynamiques de la couche d'adsorption. Ce changement de structure du à l'effet de la concentration en GdmCl, est caractérisé par une rupture de liaisons non covalentes entre les monomères des blocs bidimensionnels. Ce résultat est légitime du fait que le chlorure de guanidium change la conformation des blocs bidimensionnels à partir d'une structure à deux dimensions modérément écroulée vers une structure de chaîne 2 D à volume exclu. Donc la présence d'une concentration suffisante de dénaturant semble rompre les interactions non covalentes et induire des comportements de polymère à volume exclu. La température mène à un gonflement des molécules adsorbées et semble rompe les liaisons non covalentes qui contribuent à la structure des blocs solvophobes de la caséine- β lorsque cette protéine est adsorbée à l'interface tampon/air à partir d'un milieu non dénaturant. Ainsi, la conformation des molécules adsorbées dépend fortement d'interactions non covalentes qui ne semblent pas uniquement de nature hydrophobe.

Ces résultats expérimentaux ouvrent de nombreuses perspectives dans les domaines de la statique des protéines en solution et d'interface air/liquide. Il serait intéressant de répéter ce même type d'expérience à des très fortes concentrations de dénaturant. En plus, il serait fortement intéressant de savoir plus précisément le rôle des différentes interactions hydrophobes, électrostatiques, de Van de Waals, etc. sur la dynamique des protéines au cours du repliement. De même, une étude complémentaire en R. M. N. pourrait être envisagée.

Références :

- ¹. P.G. de Gennes, phys.Lett., A 38, 1637, (1972).
 - ². P.G. de Gennes, Scaling Concepts in Polymer Physics, Cornell University, Ithaca, (1979).
 - ³. S; Alexanders, J. Phys. (Paris), 38, 983, (1977).
 - ⁴. P.G. de Gennes, Macromolecules, 14, 1637, (1981).
 - ⁵. A. Silberberg, J. Phys. Chem., 66, 1872, (1962).
 - ⁶. D. H. Napper, Polymetric Stabilization of Colloidal Dispersions, Academic Press, London, (1983).
 - ⁷. B. Fontana et J. Thomas, J. Phys. Chem., 65, 480, (1961).
 - ⁸. K. G. Barnett, T. Cosgrove, B. Vincent, D. S. Sissons et M. Cohen-Stuart, Macromolecules, 14, 1018, (1981).
 - ⁹. I.D. Robb et R. Smith, Eur. Polym. J., 10, 1005, (1974).
 - ¹⁰. R. Varoqui et P; Déjardin, J. Chem. Phys., 66, 4395, (1977).
 - ¹¹. M. Kawaguchi, H. Hayakawa et A. Takahashi, Macromolecules, 16, 631, (1983).
 - ¹². R. Ober, L. Paz, C. Taupin et S. Boileau, Macromolecules, 16, 182 (1983).
 - ¹³. J. Pendfold et R ;K. Thomas, J. Phys : Condens. Matter, 2, 1369, (1990).
 - ¹⁴. T.P. Russel, Materials Science Reports, 5, 171, (1990).
 - ¹⁵. K. G. Barnett, T. Cosgrove, B. Vincent, A. Burgess, T. Crowley, T. King, J. Turner et T. Tadros, Polymer, 22, 283, (1981).
 - ¹⁶. L. Auvray et P; Auroy, Neutron, X-ray and Light Scattering, P. Lindner et T. Zemb eds Elsevier Science Publishers B.V. (1991).
 - ¹⁷. C. Allain, D. Ausseré et F. Rondelez, Phys. Rev. Lett., 17, 1073, (1979).
 - ¹⁸. J.N. Israelachvili et G.E. Adam, J. Chem. Soc. Faraday Trans., II74, 975, (1978).
 - ¹⁹. T.P. Russel, A. Karim, A. Mansour et G.P. Felcher, Macromolecules, 21, 609, (1988).
 - ²⁰. S.H. Anastasiadis, T.P. Russel, S.K. Satija et C.F. Majkrzak, Phys. Rev. Lett., 62, 1852, (1989).
 - ²¹. R.R. Highfield, R.K. Thomas, P.G. Cummins, D.P. Gregory, J. Mingins, J.B. Hayter et O. Sharp, Thin Solid Film, 99, 165, (1987).
 - ²². A.R. Rennie, R.J. Crawford, E.M. Lee, R.K. Thomas, T.L. Crowley, S. Roberts, M.S. Qureshi et R.W. Richards, Macromolecules, 22, 3466, (1989).
 - ²³. D.E. Graham et M.C. Phillips, J. Colloid Interface Sci, 70, 415, (1979).
 - ²⁴. J.R. Hunter, P.K. Kilpatrick et R. G. Carbonnell, J. Colloid Interface Sci, 142, 429, (1991).
 - ²⁵. E. Dickinson, D.S. Horne, J.S. Phipps, et R.M. Richardson, Langmuir, 9, 242, (1993).
 - ²⁶. G. Fragneto, R.K. Thomas, A.R. Rennie et J. Pendfold, Science, 267, 657, (1995).
 - ²⁷. P.J. Atkinson, E. Dickinson, D.S. Horne et R.M. Richardson, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 91(17), 2847, (1995).
 - ²⁸. K.D. Caldwell, J. Li, J.T. Li et D.G. Dalgleish, J. Chromatography, 604, 63, (1992).
-

29. B. Harzallah, V. Aguié-Beghin, R. Douillard et L. Bosio, *Int. J. Biol. Macromol*, 23, 73, (1998).
 30. T.A. Payens et B.W. van Markwijk, *Biochim. Biophys. Acta*, 71, 517, (1963).
 31. E. Leclerc, Thèse, Université de Paris VI, (1996).
 32. E. Leclerc et P. Calmettes, *Phys. Rev. Lett.*, 78, 150, (1997).
 33. Dickinson, E., Mc Clements, D. J. *Advances in Food Colloids*, Chapter 2, Blackie, Glasgow (1995).
 34. Anson, M.L., et Mirsky, A.E.J. *Phys. Chem.*, 35, 185, (1931).
 35. Anson, M.L., *Adv. Protein Chem.*, 2, 361, (1945).
 36. Dill, K. A. et Shortle, D. *Ann. Rev. Biochem.*, 60, 795, (1991).
 37. Shortle, D. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 66, (1993).
 38. Shortle, D. *Faseb. J.*, 10, 27, (1996).
 39. Tandford, C. *Adv. Prot. Chem.*, 23, 121, (1968).
 40. Tandford, C. *Adv. Prot. Chem.*, 21, 1, (1970).
 41. Sosnick, T. R. et Trewhella, A. *Biochemistry.*, 31, 8329, (1992).
 42. Neri, D., Billeter, M., Wider, D., et Wuthrich, K. *Science.*, 257, 1559, (1992).
 43. Evans, P.A., Topping, K.D., Woolfson, D.N. et Dobson, C.M. *Protein: Struct. Funct. Genet.*, 9, 248, (1991).
 44. Dickinson, E. et Woskett, C.M. in "*Food Colloids*", Special Publications N° 75. p. 74, Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, (1989).
 45. Darling, D.F. et Birkett, R.J. in "*Food Emulsions and Foams*" Special Publications N° 58. p. 1, Royal Society of Chemistry, Burlington House, London, (1986).
 46. Brown, L.K., Narsimhan, G. et Wankat, P.C. *Biotech. Bioeng.*, 36, 947, (1990).
 47. Benjamins, J., DeFeijter, J.A., Evans, M.T.A., Graham, D.E. et Phillips, M.C. *Discuss. Chem. Soc.*, N59, 218, (1975).
 48. MacRitchie, F. et Alexander, A.E. *J. Colloid Interface Sci.* 18, 453, (1963).
 49. Damodaran, S. et Song, K.B. *Biochim. Biophys. Acta.*, 954, 253, (1988).
 50. MacRitchie, F. *Adv. Protein Chem.*, 32, 283 (1978).
 51. MacRitchie, F. et Alexander, A.E. *J. Colloid Interface Sci.* 18, 458, (1963).
 52. MacRitchie, F. et Alexander, A.E. *J. Colloid Interface Sci.* 18, 464, (1963).
 53. Graham D.E., Phillips M.C., *J. Colloid Interface Sci.* 70, 427-439, (1979).
 54. Muramatsu, M. et Saboca, H. *J. Colloid Interface Sci.*, 18, 625, (1963).
 55. Yamashita, T. et Bull, H.B. *J. Colloid Interface Sci.*, 27, 19, (1968).
 56. Haynes, C.A. et norde, W. *Colloids Surf.*, B2, 517 (1994).
 57. Chou, P. Y. and Fasman, G. D. *Biochemistry*, 13, 211 (1974).
 58. Chou, P. Y. and Fasman, G. D. *Biochemistry*, 13, 222 (1974).
 59. Chou, P. Y. and Fasman, G. D. *Biochemistry*, 115, 135 (1977).
 60. Church, F. C., Catignani, G. L. and Swaisgood, H. E. *J. Dairy Sci.*, , 64, 724 (1981).
 61. Snoeren, T. H. M., van Marwijk, B. and van Montfort, R. *Biochim. Biophys. Acta*, , 622, 268 (1980).
 62. Swaisgood, H. E. "in *Development in Dairy Chemistry* ", edited by P. F. Fox (Elsevier Applied Science Publishers, London, 1, p. 1-58. (1982).
 63. Levitt, M. J. *Mol. Biol.*, , 59, 104 (1976).
 64. Andrews, A., Atkinson, L. D., Evans, M.T.A., Finer, E.G., Green, J. P., Phillips, M. C. and Robertson, R. N. *Biopolymers*, , 18, 1105 (1979).
 65. Tandford, C. *Physical Chemistry of Macromolecules*, , John Wiley & Sons, New York (1961).
 66. Bucheim, W. and Shmidt, D.G., *J. Dairy Res.*, , 46, 281 (1979).
 67. Berry, G. P. and Creamer, L.K. *Biochemistry*, , 14, 3542 (1975).
 68. Holt, C. *Adv. In Protein Chemistry*, , 43, 63 (1992).
-

69. Payens, T. A. J., Vreeman, H. J, Ed., p. 543 Plenum, New York.
 70. Thurn, A., Burchard, W. and Niki, R. Colloid Polymer Sci., 1987, 265, 653.
 71. Kajiwara, K., Niki, R., Urakawa, H., Donkai, N. and Nagura, M. Biochim. Biophys. Acta, 955 (1988).
 72. Ybert, C., di Meglio, J.M., Langmuir, 14, 471-475, (1998).
 73. Birdi, K.S., " *Lipid and biopolymer at liquid interfaces* ", Plenum Press, New York, (1989).
 74. Damodaran, S., Adv. Nutr. Res., 34, 1, (1990).
 75. Sadana, A., Chem. Rev., 92, 1799, (1992).
 76. Ball, A. Jones R.A.L., Langmuir, 11, 3542, (1995).
 77. Claesson, P.M., Blomberg, E. Fröberg, J.C., Nylander, T. Arnebrant T. Adv. Colloid Interface Sci., 57, 161, (1995).
 78. Stahmann, K.P., Böddecker T., Sahm H., Eur J. Biochem., 224, 220, (1997).
 79. Izmaïlova, VN, Yampolskaya, G.P., in " *Protein at liquid interfaces* " (D. Mōbious and R. Miller Eds), p 103 Elsevier, Amsterdam, (1998).
 80. Fink A. L., In B.A. Shirley Ed. " *Methods in Molecular Biology: Theory and Practice* ", Vol. 40, Humana Press Inc.L, Totowa NJ, 343, (1995).
 81. Dalgleish, D. G., Leaver, J., J. Colloid Interface Sci., 141, 288-294, (1991).
 82. Graham D.E., Phillips M.C., J. Colloid Interface Sci, 76, 227-239, (1980).
 83. Graham D.E., Phillips M.C., J. Colloid Interface Sci, 76, 240-250, (1980b)
 84. Damodaran, S., Song, K., Colloids Surf., 50, 75-86, (1990).
 85. Nylander T., Wahlgren N.M., Langmuir, 13, 6219-6225, (1997).
 86. Mellema, M, Clark, D.C., Husband F.A., Mackie, A.R., Langmuir, 14, 1753-1758, (1998).
 87. Aguié-Béghin, V., Leclerc, E., Daoud, M., and Douillard, R., J. Colloid Interface Sci. 214, 143, (1999.).
 88. Richardson J.S., Richardson D.C., In Fasman G.D. Ed " *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation* - Plenum press, New York, 1-98, (1989).
 89. Poupon, A., Mornon J.P. Proteins, 33, 329-342, (1998).
 90. Shirley, B. A. In B. A. Shirley Ed., " *Protein stability and folding : theory and practice* ", Humana Press Inc., Totowa, NJ, 177-190, (1985).
 91. Calmettes, P., Durand, D., Smith, J.C., Desmadril, D., M'nard, P., Douillard, R., J. Phys. IV, 3, 253-256, (1993).
 92. Calmettes, P., Roux, B., Durand, D., Desmadril, D., Smith, J.C., J. Mol. Biol., 231, 840-848, (1993).
 93. Calmettes, P., Durand, D., Desmadril, D., Minard, P., Douillard, R., Physica B 213/214, 754-756, (1995).
 94. Gupta, R., Yadav, S., Abmad, F. Biochemistry, 35, 11925-11930, (1996).
 95. Zhou, J.M., Fan, Y.X, Kihara, H., Kimura K., Amemiya, Y. FEBS Lett., 415, 183-185, (1997).
 96. Leclerc, E., Daoud, M., et Douillard, R. J. Colloid Interface Sci. 214, 143, (1995).
 97. Duplantier, B., et Saleur, H. Phys. Rev. Lett., 59, 539 (1987).
 98. Douillard, R. Colloids Surf B. 1, 333, (1993).
-

99. Lucassen-Reynders, E.H. in "*Anionic Surfactants*" (E. H. Lucassen, Ed.), p. 173, Dekker, New York, (1981).
 100. Jacrot, B. Rep. Prog. Phys. 39, 63 (1976).
 101. Cotton, J. P., in : *Neutrons, X-ray and light scattering*. Lindner, P. et Zemb, T., éditeurs, Elsevier Science Publishers B. V. 3-131 (1991).
 102. Cotton, J. P., 7^{ème} *Journées de la Diffusion Neutronique*, Albé (1998).
 103. Cotton, J. P., *Diffusion des neutrons aux petits angles*. J. Physique Paris, Vol. 9 (1999).
 104. Bonetti, M., Romet-Lemonne, G., Calmettes P., and Bellissent-Funel M.-C., J. Chem. Phys. 112 268 (2000).
 105. Yvon J., *Les corrélations et l'entropie en mécanique statistique classique*, (Dunod, Paris) (1966).
 106. Egelstaff P. A., *An introduction to the liquid state*, 2^{ème} édition (Clarendon Press, Oxford) (1992).
 107. Guinier A., et Fournet, G. *Small-angle scattering of X-rays*. Wiley Interscience, New York (1955).
 108. Mandelbrot, B. *Les Objets Fractals*. Flammarion, France (1984).
 109. des Cloizeaux, J. et Jannink, G. *Les Polymères en solution*. Les éditions de Physique, France (1987).
 110. Adam, M. et Lairez, D. Fractals 1, 149 (1993).
 111. Debye, J. Applied Phys. 15, 338 (1944).
 112. Rawiso, M., Duplessix, R. et Picot, C. Macromolecules 20, 630 (1987).
 113. Calmettes, P., Durand, D., Desmadril, M., Minard, P., Receveur, V. and Smith, J.C., Biophys. Chem. 53, 105, (1994).
 114. Flory, P. J. *Principles of polymers chemistry*. Cornell Univ. Press, Ithaca (1979).
 115. Le Guillou, J. C. and Zinn-Justin, J. Phys. Rev. Letters 39, 95 (1977).
 116. Benoit, H. and Doty, P. J. Phys. Chem. 57, 958 (1953).
 117. des Cloizeaux, J. Macromolecules 6, 403 (1973).
 118. Pedersen, J. S. and Schurtenberg, P. Macromolecules 29, 7602 (1996).
 119. Burchard, W. and Kajiwara, K. Proc. R. Soc. London A316, 185 (1970).
 120. Sharp, P. and Bloomfield, V. A. Biopolymers 6 1201 (1968).
 121. Utiyama, H., Tsunashima, Y. and Kurate, M. J. Chem. Phys. 55, 3133 (1971).
 122. Benoit H. and Benmouna M., Polymer 25, 1059 (1984).
 123. Zimm B. H., J. Chem. Phys. 16, 1093 (1948).
 124. Yamakawa, H. *Modern theory of polymer solutions*. Harper & Row, New York (1971).
 125. Yamakawa, H. Macromolecules 25, 1912 (1992).
 126. Yamakawa, H., Abe, F. and Einaga, Y. Macromolecules 26, 1998 (1993).
 127. Lairez, D. Rapport d'activité du LLB CEA Saclay (1995).
 128. Calmettes, P., J. Phys. IV France, 9, Pr1-83, (1999).
 129. Lee L.T., Mann EK, Langevin D., Famoux B. Langmuir, 7, 3076, (1991).
 130. Pedersen, J. S., J. Appl. Cryst., 25, 129, (1992).
 131. Kunz, K. et al. Macromolecules, 26, 4316, (1993).
 132. Sivia, D. S. et al. Physica B, 173, 121, (1991).
 133. O. Guiselin, Thèse doctorat, Paris VI, (1993).
-

- ¹³⁴ Labourdenne, S., Gaudry-Rolland, N., Letellier, S., Lin, M., Cagna, A., Esposito, G., Verger, R., and Rivière, C., *Chem. Phys. Lipids* 71, 163, (1994).
- ¹³⁵ McKenzie, H., Sawyer, A. *Milk proteins : Chemistry and molecular biology*. II, 258. Academic Press, London. (1971).
- ¹³⁶ Nozaki, Y. *Methods Enzymol.*, 26, 43 (1970).
- ¹³⁷ Des Cloiseaux, J. Duplantier, B. *J. Physique Lett.* 46, L-457, (1985).
- ¹³⁸ Puff, N., Cagna, A., Aguié-Béghin, V., and Douillard, R., *J. Colloid Interface Sci.* 208, 405 (1998).
- ¹³⁹ Bouchaud, E., Daoud, M., *J. Physique*, 48, 1991-2000, (1987).
- ¹⁴⁰ Schmidt (1972) ;
- ¹⁴¹ Aschi, A., Gharbi, A., Bitri, L., Daoud, M., Aguié-Béghin, V., Douillard, R., and Calmettes, P. accepted à *Langmuir* (2000).
- ¹⁴² An, S. W., Thomas, R ; K., Baines, F. L., Billingham, N. C., Armes, S. P. and Penfold, J., *J. Phys. Chem. B.* 102, 387-393, (1998).
- ¹⁴³ An, S. W., Thomas, R ; K., Baines, F. L., Billingham, N. C., Armes, S. P. and Penfold, J., *J. Phys. Chem. B.* 102, 5120-5126, (1998).
- ¹⁴⁴ An, S. W., Thomas, R ; K., Baines, F. L., Billingham, N. C., Armes, S. P. and Penfold, J., *Macromolecules* . 31, 7877-7885, (1998).
- ¹⁴⁵ Benjamins (1996).
- ¹⁴⁶ Puggelli, M., Noncentini, M., Gabielli, G., Poletti, L., *Nuov. Cim.* 16D, 1529-1536, (1994).
- ¹⁴⁷ Clegg, R. S., Reed, S. M., Hutchison, J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 2486-2487, (1998).
-